

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München



**Untersuchungen zur physiologischen Rolle der  
CNGB1-Untereinheit im Riechprozess  
anhand einer CNGB1-defizienten Mauslinie**

Adelheid Geiger  
aus  
München

2007

## **Erklärung**

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. Martin Biel betreut.

## **Ehrenwörtliche Versicherung**

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 05.02.2007

---

Adelheid Geiger

Dissertation eingereicht am	06.02.2007
1. Gutachter	Prof. Dr. M. Biel
2. Gutachter	PD Dr. C. Culmsee
mündliche Prüfung am	08.03.2007

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>INHALTSVERZEICHNIS.....</b>	<b>3</b>
<b>ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>6</b>
<b>DRITTMITTEL .....</b>	<b>7</b>
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>8</b>
1.1 CNG-Kanäle.....	8
1.2 CNGB1 .....	10
1.3 Das olfaktorische System.....	11
1.4 Transgene Mäuse mit olfaktorischem Phänotyp .....	16
1.5 Funktion und Bedeutung des primären Ziliums .....	18
1.6 Zielsetzung der Arbeit.....	20
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>21</b>
2.1 Chemikalien, Lösungen, Puffer.....	21
2.2 Arbeiten mit DNS.....	22
2.2.1 Gewinnung und Reinigung von genomischer DNS .....	22
2.2.2 Amplifikation von DNS .....	23
2.2.3 Enzymatische Modifikation von DNS.....	25
2.2.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNS-Fragmenten .....	26
2.2.5 Amplifikation und Isolierung von Plasmiden .....	27
2.3 Arbeiten mit RNS .....	29
2.4 Isolierung von RNS aus Mausgewebe.....	29
2.5 RT-PCR .....	29
2.6 Arbeiten mit Proteinen .....	31
2.6.1 Isolierung des olfaktorischen Epithels aus Mäusen.....	31
2.6.2 Isolierung des Bulbus olfactorius für Immunhistochemie .....	32
2.6.3 Gewinnung von Proteinen durch Lyse.....	32
2.6.4 Gewinnung von Membranproteinen aus Gewebe und Zellen .....	33
2.6.5 Anreicherung von olfaktorischen Zilien aus dem Riechepithel.....	33
2.6.6 Quantifizierung von Proteinen .....	34
2.6.7 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen .....	34
2.6.8 Western Blot .....	35
2.6.9 Co-Immunpräzipitation.....	35
2.6.10 Histologie .....	36
2.6.11 Immunhistochemie.....	38
2.6.12 Mikroskopie.....	38
2.6.13 Aufreinigung von Antikörpern .....	39
2.6.14 Fluoreszenzmarkierung von Antikörpern .....	39
<b>2.7 Kultur eukaryotischer Zellen.....</b>	<b>40</b>
2.7.1 Kultur von HEK293-Zellen .....	40

2.7.2	Transfektion von HEK293-Zellen.....	40
2.8	Verwendete Mauslinien.....	41
2.9	Zucht und Haltung genetisch veränderter Mäuse.....	41
2.10	Verhaltenstests.....	41
2.10.1	Open Field Test .....	41
2.10.2	Riechtest.....	42
2.11	Hemmung des Proteasoms .....	42
2.12	Induktion von Fos im Bulbus olfactorius.....	42
2.13	Aufnahme von Elektroolfaktogrammen .....	42
2.14	Calcium Imaging.....	43
2.15	Elektrophysiologie .....	43
2.16	Statistik.....	43
3	ERGEBNISSE .....	44
3.1	Expression von CNGB1b.....	44
3.2	Vermindertes Körpergewicht bei CNGB1KO-Mäusen .....	46
3.3	CNGB1KO-Mäuse zeigen eingeschränktes Riechvermögen .....	47
3.4	Das explorative Verhalten der CNGB1KO-Mäuse unterscheidet sich nicht von WT-Mäusen .....	48
3.5	Die Schichtdicke des olfaktorischen Epithels von CNGB1KO-Tieren ist vermindert .....	50
3.6	Normale Expression von OMP und ACIII in CNGB1KO-Mäusen .....	51
3.7	Der Bulbus olfactorius von CNGB1KO-Tieren ist verkleinert, aber funktionsfähig .....	52
3.8	Veränderte Kinetik und Amplitude der Duftantwort von CNGB1KO-Mäusen im EOG ....	54
3.9	Der CNG-Strom in CNGB1KO-Tieren ist stark verringert und weniger sensitiv gegenüber zyklischen Nukleotiden .....	56
3.10	Fehlende Ca-CaM-abhängige Inhibierung des CNG-Stroms in CNGB1KO-ORNs.....	59
3.11	CNGB1 und CNGB2 interagieren in CNGB1KO-ORNs .....	60
3.12	Der Verlust von CNGB1b führt zu einer Retention des Kanals in subziliären Kompartimenten .....	61
3.13	CNGB1b und CNGB4 sind für den Transport des CNG-Kanals ins Zilium essentiell .....	63
3.14	Akkumulation von CNGB2 und CNGB4 im olfaktorischen Epithel von CNGB1KO-Mäusen führt nicht zu einer Translokation des CNG-Kanals in die Zilien.....	64

<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>66</b>
<b>4.1</b>	<b>Deletion von CNGB1b im olfaktorischen CNG-Kanal führt zu eingeschränkter Riechfunktion.....</b>	<b>66</b>
<b>4.2</b>	<b>Der Verlust von CNGB1b resultiert in morphologischen Veränderungen des olfaktorischen Systems .....</b>	<b>68</b>
<b>4.3</b>	<b>Gestörtes Targeting des CNGB1KO-Kanals .....</b>	<b>69</b>
<b>4.4</b>	<b>Aktivierung des CNGB1KO-Kanals .....</b>	<b>70</b>
<b>4.5</b>	<b>Retinaler Phänotyp der CNGB1KO-Maus<sup>94</sup> .....</b>	<b>71</b>
<b>4.6</b>	<b>CNGB1-Defekt im Menschen.....</b>	<b>72</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>73</b>
<b>6</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>74</b>
<b>6.1</b>	<b>Verwendete Primer .....</b>	<b>74</b>
<b>6.2</b>	<b>Proteinmengen für Western Blots .....</b>	<b>75</b>
<b>6.3</b>	<b>Verwendete Antikörper .....</b>	<b>76</b>
6.3.1	Primärantikörper .....	76
6.3.2	Fluoreszenzmarkierte Primärantikörper .....	76
6.3.3	Sekundärantikörper .....	77
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>78</b>
<b>8</b>	<b>PUBLIKATIONEN .....</b>	<b>88</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>89</b>
<b>10</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>90</b>

## ABKÜRZUNGEN

-/-	Knockout, defizient für angegebenes Gen
+/-	heterozygot für angegebenes Gen
+/+	Wildtyp
ACIII	Adenylatzyklase III
APS	Ammonimperoxidsulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CaM	Calmodulin
cAMP	zyklisches Adenosin-3', 5'-monophosphat
cDNS	komplementäre DNS
cGMP	zyklisches Guanosin-3', 5'-monophosphat
CNBD	Zyklonukleotid-Bindungsdomäne
CNG	cyclic nucleotide gated, Zyklonukleotid-aktiviert
DKO	CNGB1/A3-Doppel-KO
DMEM	Dulbecco's modified eagle Medium
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DTE	1,4-Dithioerythritol
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
eGFP	enhanced green fluorescent protein, verstärktes grünes fluoreszierendes Protein
EOG	Elektroolfaktogramm
EtOH	Ethanol
FBS	fötales Rinderserum
FITC	Fluoresceinisoithiocyanat
GC	Guanylatzyklase
HEK293	human embryonic kidney cells, humane embryonale Nierenzelllinie, Klon 293
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HZ	heterozygot
IFT	intraflagellarer Transport
IHC	Immunhistochemie
IRES	internal ribosome entry site
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KO	Knockout
MeOH	Methanol
NCS	normales Hühnerserum
NGS	normales Ziegenserum
NHS-Ester	N-Hydroxysuccimidylester
n. s.	nicht signifikant
OB	Bulbus olfactorius
OE	olfaktorisches Epithel

OMP	olfaktorisches Marker Protein
OR	olfaktorischer Rezeptor
ORN	olfaktorisches Rezeptorneuron
P	postnataler Tag
PAGE	<b>P</b> olyacrylamid- <b>G</b> elelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Elektrolytlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
PFA	Paraformaldehyd
PVDF	Polyvinyliden-Difluorid
PW	postnatale Woche
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrimdodecylsulfat
SEM	standard error of the mean, Standardfehler
TBS	Tris-gepufferte Elektrolytlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TH	Tyrosinhydroxylase
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
WT	Wildtyp

## DRITTMITTEL

Diese Arbeit wurde durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) unterstützt (DFG-Antragsnummer 1254/1-1 und GE 1254/1-2).

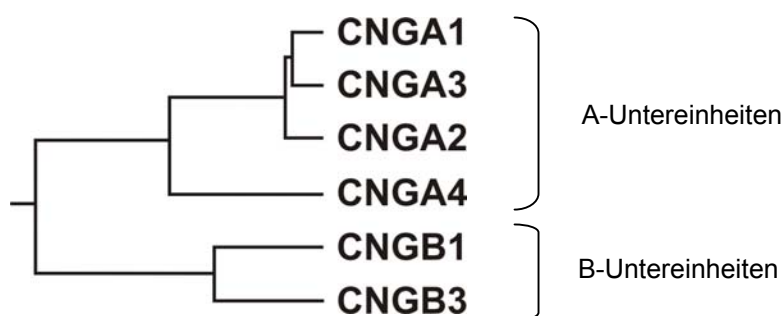
# 1 EINLEITUNG

## 1.1 CNG-Kanäle

Zyklonukleotid-aktivierte Kationenkanäle (cyclic nucleotide gated channels, CNG-Kanäle) sind nichtselektive Ionenkanäle, die durch cAMP und cGMP aktiviert werden. Sie werden unter anderem in Photorezeptoren und Riechneuronen exprimiert, wo sie eine zentrale Rolle in den entsprechenden sensorischen Signaltransduktionswegen spielen. Entdeckt wurde der CNG-Strom bereits in den 80er Jahren von Fesenko und Nakamura<sup>1,2</sup>. Auch in anderen Geweben, wie z. B. in der Niere<sup>3</sup>, in der Aorta<sup>3</sup> oder im Herzen<sup>4</sup> konnten seitdem CNG-Kanäle nachgewiesen werden (Übersicht in Kaupp und Seifert 2002<sup>5</sup>). Die Funktion der CNG-Kanäle in diesen Geweben ist allerdings noch immer nicht geklärt.

Mittlerweile sind sechs CNG-Kanaluntereinheiten von Säugern kloniert worden<sup>3,6-13</sup>, die in A-Untereinheiten (CNGA1, A2 und A3) und B-Untereinheiten (CNGB1, B2 und B3) eingeteilt werden können.

Die A-Untereinheiten unterscheiden sich von den B-Untereinheiten dadurch, dass sie in heterologen Expressionssystemen funktionsfähige homomere, durch zyklische Nukleotide aktivierbare Kanäle bilden können. Eine Ausnahme bildet hier lediglich der CNGA4-Kanal, der diese Fähigkeit nicht besitzt<sup>10,14</sup>. Es konnte zwar gezeigt werden, dass ein homomerer CNGA4-Kanal in HEK293-Zellen exprimiert werden kann, jedoch lassen sich hier Ströme nur durch den second messenger Stickstoffmonoxid (NO), nicht aber durch zyklische Nukleotide, induzieren<sup>15</sup>. Aufgrund seiner hohen Sequenzhomologie wurde CNGA4 letztlich den A-Untereinheiten zugeordnet.



**Abb. 1-1** Phylogenetischer Stammbaum der CNG-Kanaluntereinheiten.

Eine CNG-Untereinheit ist jeweils aus sechs Transmembransegmenten zusammengesetzt, wobei die leitfähige Pore vom fünften und sechsten Segment gebildet wird. N- und C-Terminus liegen jeweils intrazellulär. Am C-Terminus findet sich eine Bindungstasche für zyklische Nukleotide (CNBD)<sup>6</sup>. Die Pore ist vor allem durchlässig für Natrium- und Calcium-Ionen, jedoch werden auch andere mono- und divalente Kationen geleitet.

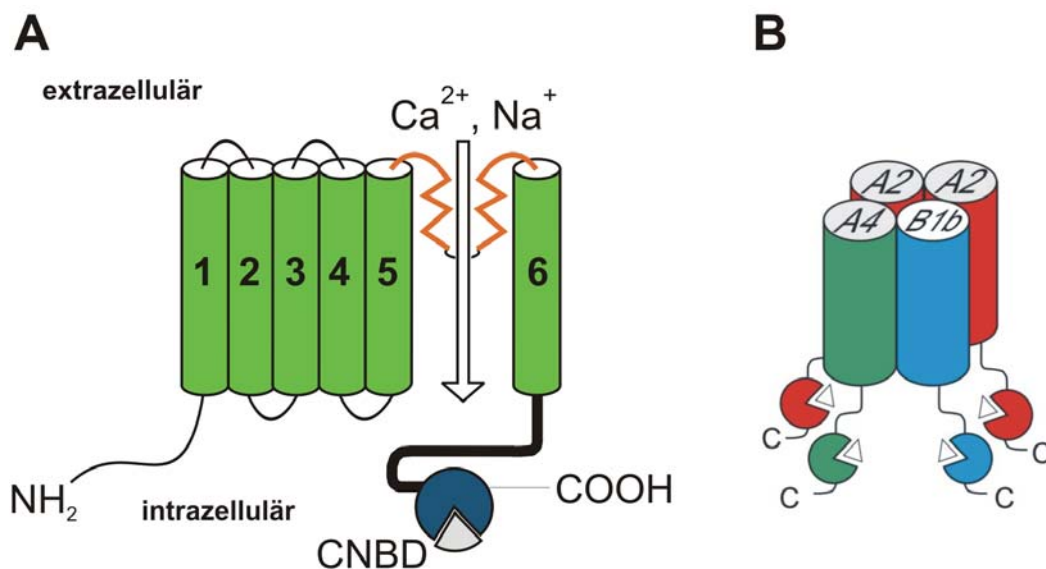


Native CNG-Kanäle sind Heterotetramere<sup>16</sup>. Je nach Zelltyp assemblieren verschiedene A- und B-Untereinheiten in einem bestimmten stöchiometrischen Verhältnis.

Der CNG-Kanal der Zapfen besteht aus jeweils zwei CNGA3- und CNGB3-Untereinheiten<sup>17</sup>, der CNG-Kanal der Stäbchen setzt sich aus drei CNGA1- und einer CNGB1a-Untereinheit zusammen<sup>18-20</sup> und der CNG-Kanal in Riechneuronen besteht aus zwei CNGA2-, einer CNGA4 und einer CNGB1b-Untereinheit<sup>21</sup>.

Entsprechend der unterschiedlichen Zusammensetzung in den verschiedenen Geweben zeigen die CNG-Kanäle auch unterschiedliche charakteristische Eigenschaften, die unter anderem Öffnungswahrscheinlichkeit, Ionenleitfähigkeit und Ligandensensitivität betreffen<sup>5,22-25</sup>.

Werden CNG-Kanäle in entsprechendem Verhältnis in heterologen Expressionssystemen wie z.B. HEK293-Zellen exprimiert und elektrophysiologisch vermessen, so haben die Ströme aus den heterologen Systemen sehr ähnliche Eigenschaften wie die nativen Ströme<sup>9,10,14</sup>. Werden dagegen nur A-Untereinheiten exprimiert, bilden sich zwar prinzipiell funktionsfähige homomere Kanäle, einige charakteristische Eigenschaften der nativen Kanäle allerdings gehen dabei verloren.

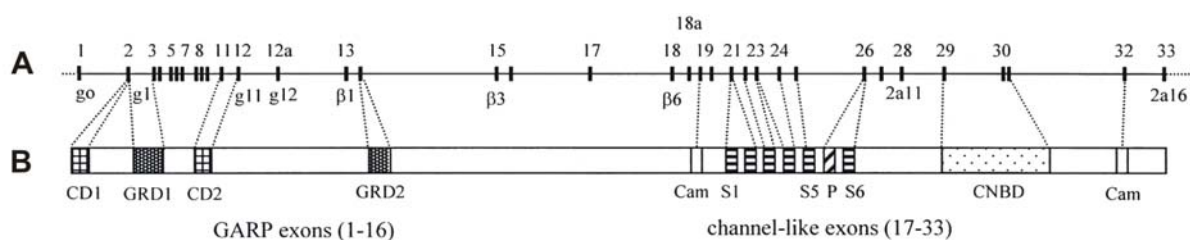


**Abb. 1-2 A** Schematische Darstellung einer CNG-Kanaluntereinheit. Die leitfähige Pore befindet sich zwischen dem fünften und sechsten Segment, C- und N-Terminus sowie die CNBD liegen intrazellulär. **B** Schematische Darstellung des CNG-Kanals in olfaktorischen Rezeptorneuronen. CNGA2-, CNGA4- und CNGB1b-Untereinheiten lagern sich zu einem Heterotetramer zusammen.

## 1.2 CNGB1

Das humane CNGB1-Gen besteht aus 33 Exons<sup>26</sup>. Durch alternatives Splicing entstehen mehrere funktionelle Proteine, die sich jeweils im N-Terminus unterscheiden.

Die CNGB1-Untereinheit in Photorezeptoren wird als CNGB1a bezeichnet und von den Exons 1-33 kodiert. In olfaktorischen Rezeptorneuronen findet man eine kürzere Variante, CNGB1b, welche erst ab dem alternativen Exon 18a translatiert wird. Im Hoden von Rindern wurden weitere CNGB1b-Varianten nachgewiesen<sup>27,28</sup>.



**Abb. 1-3** Organisation des humanen CNGB1-Locus. **A** Exon-Intron-Struktur. **B** Humanes CNGB1-Protein. (Abb. aus Ardell et al. 2000<sup>26</sup>)

In heterologen Expressionssystemen konnte gezeigt werden, dass die modulatorische Untereinheit CNGB1b die Sensitivität des Kanals gegenüber zyklischen Nukleotiden<sup>10,12,29</sup> erhöht und eine wichtige Rolle bei der Ca-CaM-abhängigen Inhibition von CNG-Kanälen spielt<sup>30</sup>.

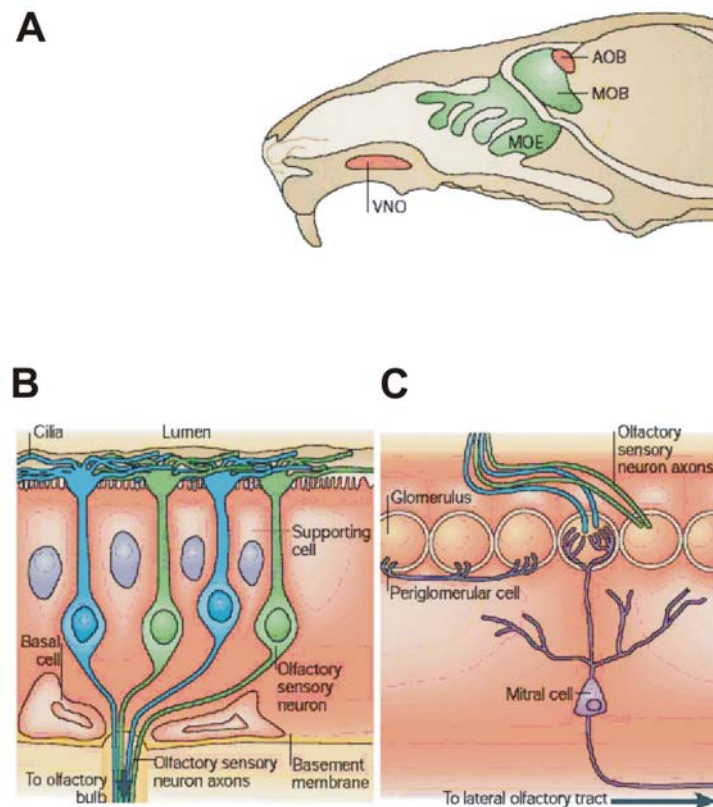
CNGB1b besitzt zwei verschiedene Bindungsstellen für Calmodulin, wobei die N-terminal gelegene Bindungsstelle vom IQ-Typ *in vitro* verantwortlich für die Ca-CaM-vermittelte Adaptation ist<sup>30</sup>. Calmodulin ist auch in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  (man spricht dann auch von Apocalmodulin= $\text{Ca}^{2+}$ -freies Calmodulin) an die IQ-Typ-Bindungsstelle gebunden. Die zweite Bindungsstelle, eine basische amphiphile Alpha-Helix (Baa-Typ), ist C-terminal gelegen und trägt offenbar nicht zur Ca-CaM-abhängigen Inhibition der CNG-Kanäle bei. Wird diese Bindungsstelle im olfaktorischen CNG-Kanal entfernt, bleibt die Ca-CaM-abhängige Inhibition unbeeinflusst<sup>30</sup>.

### **1.3 Das olfaktorische System**

Die Perzeption von Duftstoffen erfolgt über hochspezialisierte neuronale Zellen der Riechschleimhaut (olfaktorisches Epithel), den sogenannten olfaktorischen Rezeptorneuronen (ORNs)<sup>31</sup>. Die Riechschleimhaut befindet sich im hinteren Teil der Nasenhöhle und ist von einer schützenden Schleimschicht bedeckt. Sie ist zum Zwecke der Oberflächenvergrößerung in zahlreiche Windungen, die sogenannten Turbinalien, eingestülpt. Neben den ORNs findet man im olfaktorischen Epithel noch weitere Zelltypen wie Stützzellen, schleimproduzierende Bowman'sche Drüsenzellen und Basalzellen.

ORNs nehmen eine Sonderstellung unter den Neuronen ein, da sie als einzige Nervenzellen in direktem Kontakt mit der Außenwelt stehen. Somit sind sie verschiedenen Noxen, wie zum Beispiel Temperaturschwankungen, toxischen Gasen oder Infektionserregern, ausgesetzt. Um einen Verlust des Geruchssinns durch Degeneration der olfaktorischen Rezeptorneurone zu vermeiden, besitzen diese die Fähigkeit, sich regelmäßig zu erneuern. Die Lebensdauer einer solchen Zelle beträgt etwa 35-60 Tage<sup>32</sup>. Vorläufer der ORNs sind olfaktorische Stammzellen, die sogenannten Basalzellen<sup>32</sup>.

Bei olfaktorischen Rezeptorneuronen handelt es sich um bipolare Neuronen, deren Dendrit in einer Knopf-artigen Struktur, dem sogenannten dendritischen Knob (oder auch Riechköpfchen), endet. Von diesem Knob ausgehend ragen 20-50 feine unbewegliche Haare, die olfaktorischen Zilien, in die Mukusschicht hinein. In der Membran dieser Zilien findet die Signaltransduktion statt. Die Axone der ORNs (auch als Filia olfactoria bezeichnet) sind in Glia-ähnliche Hüllzellen (ensheathing cells) eingebettet. Die Gesamtheit aller Filia olfactoria bezeichnet man als Nervus olfactorius (1. Hirnnerv). Durch die Siebbeinplatte ziehen die Axone zum Bulbus olfactorius (Riechkolben), der ersten zentralnervösen Verarbeitungsstelle im Riechprozess. Dort enden die Axone in kreisförmigen Strukturen am Rand des Bulbus olfactorius, den sogenannten Glomeruli. Bei der Maus existieren insgesamt circa 1800 solcher Glomeruli<sup>33</sup>. Eine Weiterverschaltung in höhere Hirnregionen findet ausgehend von diesen Glomeruli unter Beteiligung von Mitralzellen statt.



**Abb. 1-4 A** Schematische Darstellung der Lage des olfaktorischen Epithels (MOE) und des Bulbus olfactorius (MOB) in der Nasenhöhle der Maus. VNO: Vomeronasalorgan, AOB: akzessorischer Bulbus olfactorius. **B** Schematischer Querschnitt durch das olfaktorische Epithel der Maus. **C** Schematische Darstellung der Verschaltung im Bulbus olfactorius. (Abb. nach Peter Mombaerts<sup>34</sup>).

Die Signaltransduktion findet in der Membran der olfaktorischen Zilien statt<sup>2</sup>, wo Duftstoffe an Odorantrezeptoren (ORs) binden. Odorantrezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, wovon bei der Maus über 1000 verschiedene Subtypen<sup>35</sup> (beim Menschen nur knapp 400, da es sich bei mehr als 60% der menschlichen OR-Gene um Pseudogene handelt<sup>36</sup>) existieren. Jedes ORN kann dabei nur einen einzigen Rezeptortyp exprimieren (ein Rezeptor - ein Neuron - Hypothese)<sup>37</sup>. Axone aus ORNs mit dem gleichen Rezeptortyp ziehen in einen gemeinsamen Glomerulus im Bulbus olfactorius. Wie die Signalkaskade im Detail verläuft, wird nachfolgend dargestellt.

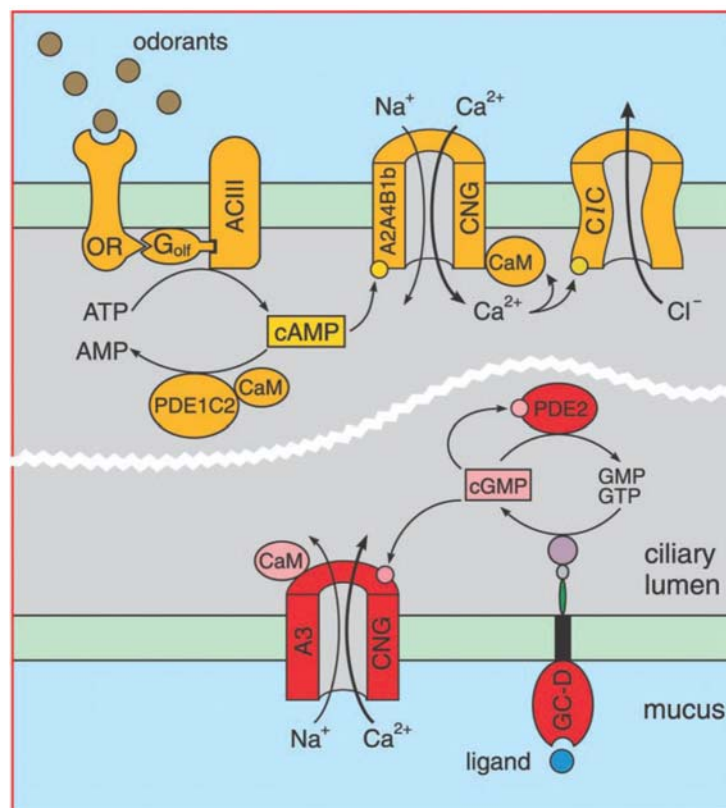
Nach Bindung des Duftstoffes aktiviert das G-Protein  $G_{olf}$  die Adenylatzyklase III (ACIII). Es folgt eine Umsetzung von Adenosinmonophosphat (AMP) zu zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP). Das gebildete cAMP bindet nun an den olfaktorischen CNG-Kanal, der in der Folge geöffnet wird und somit ein Einstrom von Kationen, hauptsächlich Calcium, erfolgt<sup>38</sup>. Das einströmende Calcium erfüllt drei wichtige Funktionen: erstens kommt es zu einer leichten Depolarisation der Zelle, zweitens wird ein Calcium-aktivierter Chlorid-Kanal geöffnet, wodurch es zu einer Verstärkung der Depolarisation kommt<sup>39-41</sup> und drittens interagiert Calcium mit Calmodulin und trägt damit zur Ca-CaM-abhängigen Inaktivierung bei<sup>30,42</sup>. Ca-CaM interagiert mit dem CNG-Kanal und reduziert dessen Sensitivität gegenüber cAMP. Darüber hinaus aktiviert Ca-CaM die Phosphodiesterase 1C2 (PDE1C2)<sup>43,44</sup>,

wodurch ein aktiver Abbau von cAMP stattfindet (Abb. 1-5). Die Inhibition durch Ca-CaM bildet die molekulare Grundlage der sogenannten schnellen Duftadaptation.

Die schnelle Adaptation ist der Grund dafür, warum selbst starke Gerüche nach einer gewissen Zeit nicht mehr wahrgenommen werden können. Dieser Mechanismus ist sehr wichtig, da so neu auftretende Gerüche schon in geringen Konzentrationen detektiert werden können.

Neben der Adaptation über Ca-CaM kommt es bei Stimulierung der ORNs mit Düften über einen längeren Zeitraum hinweg außerdem noch zu anderen Adaptationsvorgängen durch Phosphorylierung von Odorantrezeptoren<sup>45</sup> und der Adenylatzyklase<sup>46</sup> (Übersicht über die Duftadaptation in Zufall und Leinders-Zufall 2000<sup>47</sup>). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass auch Duftstoffe selbst in geringem Ausmaß eine hemmende Wirkung auf CNG-Kanäle ausüben<sup>48</sup>.

Neben dem beschriebenen Signalweg über cAMP existiert in einer Subpopulation olfaktorischer Neuronen eine cGMP-vermittelte Signalkaskade<sup>49-51</sup>. Hier findet man ORNs, die anstelle des olfaktorischen CNG-Kanals einen CNGA3-Kanal, also einen CNG-Kanal vom Zapfen-Typ, exprimieren. Anstatt der ACIII ist hier die Guanylatzyklase D (GC-D) aktiv, der Abbau von cGMP erfolgt durch die Phosphodiesterase 2 (PDE2). Diese Subpopulation von ORNs befindet sich im hinteren Teil des olfaktorischen Epithels und projiziert auf einige wenige Glomeruli am hinteren Rand des Bulbus olfactorius, welche auch als „necklace Glomeruli“ bezeichnet werden. Welche Funktion diese Neuronen erfüllen, ist bisher ungeklärt.



**Abb. 1-5** Signaltransduktion in olfaktorischen Rezeptorneuronen (Abb. aus Kaupp und Seifert<sup>5</sup>). Duftstoffe binden an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor (OR), worauf eine Aktivierung von  $G_{olf}$  folgt. Das aktivierte G-Protein stimuliert die Adenylatzyklase (ACIII) zur Synthese von cAMP, welches den olfaktorischen CNG-Kanal (A2A4B1b CNG) öffnet. Durch den Einstrom von  $Ca^{2+}$  wird ein nachgeschalteter  $Ca^{2+}$ -aktivierter Chloridkanal (ClC) geöffnet. Der Ausstrom von Chlorid-Ionen führt zusammen mit dem Einstrom von  $Ca$ -Ionen zur Depolarisation der Membran. Der Abbau von cAMP erfolgt durch die Phosphodiesterase 1C2 (PDE1C2).  $Ca^{2+}$ -Calmodulin ( $Ca^{2+}$ -CaM) interagiert einerseits mit dem CNG-Kanal und andererseits mit der PDE1C2 und trägt damit zur Inaktivierung des Kanals bei. In einer Subpopulation von ORNs existiert ein cGMP-vermittelter Signalweg (unten). Anstelle des olfaktorischen CNG-Kanals findet man hier einen CNGA3-Kanal, der Abbau von cGMP erfolgt über die PDE2.

Bei Mäusen findet man neben den ORNs in der Riechschleimhaut noch ein zweites Riechsystem im sogenannten Vomeronasalorgan (VNO, Jacobson'sches Organ). Die Neuronen des VNO dienen in erster Linie der Wahrnehmung von Pheromonen und beeinflussen so das Sozial- und Reproduktionsverhalten zwischen den Tieren<sup>52-54</sup>.

Die Axone von Neuronen des VNO ziehen in einen spezialisierten Teil des Bulbus olfactorius, den sogenannten akzessorischen Bulbus olfactorius (vgl. Abb. 1-4), wo die weitere Verschaltung erfolgt.

Während noch vor kurzer Zeit eine strenge anatomische und funktionelle Abgrenzung des VNO vom Hauptgeruchssystem angenommen wurde, ist mittlerweile bekannt, dass die Detektion und Verarbeitung von Pheromonen eng verbunden mit dem Hauptgeruchssystem ist<sup>55-58</sup>.

Welche Funktion das Vomeronasalorgan beim Menschen spielt bzw. ob es dort in funktionsfähiger Form überhaupt existiert, ist bisher unbekannt.

## 1.4 Transgene Mäuse mit olfaktorischem Phänotyp

Die Erzeugung und Untersuchung verschiedener Knockout-Mäuse hat wesentlich zum Verständnis des Riechprozesses beigetragen. Die wichtigsten KO-Linien werden nachfolgend kurz vorgestellt.

### **CNGA2-Knockout**<sup>55,59,60</sup>

Eine Methode, um die Funktionsfähigkeit des olfaktorischen Epithels zu untersuchen, ist die Aufnahme von Elektroolfaktogrammen (EOGs). Analog dem Elektrokardiogramm oder dem Elektroretinogramm werden auch beim EOG elektrische Potentiale in Abhängigkeit einer Stimulierung (hier: Aktivierung der olfaktorischen Rezeptorneuronen durch Einzeldüfte oder Duftgemische) aufgenommen. Im Elektroolfaktogramm heterozygoter und homozygoter CNGA2KO-Mäuse ist nur mit einigen wenigen Düften in hoher Konzentration eine Antwort induzierbar. Diese fällt allerdings wesentlich kleiner aus als beim Wildtyp. Auf die meisten Düfte reagieren diese Mäuse anosmisch, sie können sie nicht wahrnehmen. Neugeborene CNGA2-defiziente Mäuse zeigen zudem eine erhöhte postnatale Sterblichkeit, da sie aufgrund des fehlenden Riechvermögens die Zitzen der Mutter nicht finden können. Interessanterweise ist die Detektion von Pheromonen bei CNGA2KO-Tieren offenbar nicht gestört.

Morphologisch unterscheidet sich das olfaktorische Epithel von CNGA2-defizienten Mäusen durch eine verringerte Schichtdicke, während der prinzipielle Aufbau des Epithels unverändert ist. Zudem werden das olfaktorische Marker Protein (OMP), welches ausschließlich in reifen olfaktorischen Rezeptorneuronen exprimiert wird<sup>61</sup>, und das growth associated protein 43, ein Marker für unreife ORNs<sup>62</sup>, in geringerem Maße gebildet als in Wildtyp-Epithel. Die Reifung und Neubildung der olfaktorischen Rezeptorneuronen ist bei diesen Mäusen also negativ beeinflusst. Andere Bestandteile der Signalkaskade, wie die ACIII und  $G_{olf}$  werden dagegen normal exprimiert, woraus auf eine intakte Zilienstruktur zu schließen ist. Das Expressionsmuster von Odorantrezeptoren ließ sich ebenfalls nicht vom Wildtyp unterscheiden.

Neben den Veränderungen im olfaktorischen Epithel fällt bei CNGA2-defizienten Mäusen der stark verkleinerte Bulbus olfactorius auf. Dieser wird zwar von OMP-positiven Nervenfasern innerviert, welche aber im Vergleich zum Wildtyp aberrante Strukturen aufweisen. Ein Markerprotein für die neuronale Aktivität des Bulbus olfactorius, die Tyrosinhydroxylase, wird ausschließlich in den sogenannten „necklace glomeruli“ (siehe Punkt 1.3) exprimiert. Daraus lässt sich schließen, dass das verbleibende Riechvermögen der Mäuse auf den cGMP-vermittelten Signalweg zurückzuführen ist. In allen anderen periglomerulären Zellen ist keine Expression der Tyrosinhydroxylase zu beobachten, diese Zellen erhalten also keinen neuronalen Input von olfaktorischen Rezeptorneuronen.

### **CNGA4-Knockout**<sup>63,64</sup>

Im Gegensatz zur CNGA2KO-Maus sind CNGA4-defiziente Tiere nicht anosmisch. Diese Mäuse zeigen eine Duftantwort im EOG, welche allerdings im Vergleich zum Wildtyp viel langsamer abklingt, was auf ein Fehlen der Ca-CaM-abhängigen Adaptation zurückzuführen ist.



CNGA4-defiziente Mäuse sind außerdem sowohl in der Lage, strukturell sehr ähnliche Düfte (z. B. Heptanol und Oktanol) voneinander zu unterscheiden, als auch unterschiedliche Konzentrationen gleicher Düfte wahrzunehmen. Allerdings liegt die Schwelle für die Detektion von Düften bei wesentlich höheren Konzentrationen (Faktor 40) als bei Wildtyp-Tieren. Dieser Sachverhalt kann durch die beobachtete verringerte Affinität des CNGA4-defizienten Kanals zu cAMP erklärt werden.

Setzt man CNGA4KO-Mäuse einem Hintergrundgeruch aus, so verlieren die Mäuse die Fähigkeit, Düfte voneinander zu unterscheiden. Dieses Phänomen beruht vermutlich auf einem Depolarisationsblock, ausgelöst durch eine Dauerstimulierung des CNG-Kanals und damit auch des nachgeschalteten Chloridkanals. Sobald sich alle spannungsabhängigen Natriumkanäle im geschlossen inaktivierbaren Zustand befinden, verliert die Maus die Fähigkeit zur Geruchsdetektion.

Das Körpergewicht ist bei CNGA4KO-Tieren im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert. Heterozygote CNGA4-Mäuse zeigen keinen Phänotyp.

### **ACIII-Knockout<sup>65,66</sup>**

ACIII-Knockout-Tiere sind nicht in der Lage, Düfte über ORNs des Riechepithels zu detektieren, sie sind völlig anosmisch. Interessanterweise zeigen heterozygote Tiere einen intermediären Phänotyp: im EOG ist eine Duftantwort sichtbar, jedoch fällt diese wesentlich kleiner aus als beim Wildtyp. Wie bei CNGA2-defizienten Tieren ist auch hier die Wahrnehmung von Pheromonen nicht gestört.

Auch hier zeigen neugeborene homozygote KO-Tiere eine erhöhte Sterblichkeitsrate. Das anfangs reduzierte Körpergewicht der ACIII-defizienten Tiere gleicht sich im Laufe der Entwicklung der Mäuse an den Wildtyp an und ist ab einem Alter von ca. drei Monaten bei beiden Genotypen gleich.

Die Expression von OMP und  $G_{olf}$  im olfaktorischen Epithel von ACIIIKO-Mäusen unterscheidet sich nicht vom Wildtyp. Über eine verringerte Schichtdicke des Epithels wurde nicht berichtet.

### **$G_{olf}$ -Knockout<sup>67</sup>**

Erwachsene homozygote  $G_{olf}$ KO-Mäuse sind ebenso wie ACIII-Knockout-Mäuse anosmisch. Interessanterweise zeigen neugeborene homozygote KO-Tiere noch eine Restantwort im EOG (verglichen mit dem Wildtyp um 75% verringert). Vermutlich ist dies auf die Interaktion von Odorantrezeptoren mit einem weiteren G-Protein der olfaktorischen Zilien zurückzuführen. Werden die Tiere älter, wird weniger von diesem G-Protein gebildet, woraus letztlich ein kompletter Verlust der Riechfähigkeit resultiert. Homozygote Neugeborene von heterozygoten Müttern zeigen ebenfalls eine erhöhte Sterblichkeit, ein geringer Teil der Mäuse überlebt aber bis ins Erwachsenenalter. Tiere von homozygoten Müttern sterben ausnahmslos, da sie vom Muttertier nicht gesäugt und umsorgt werden.

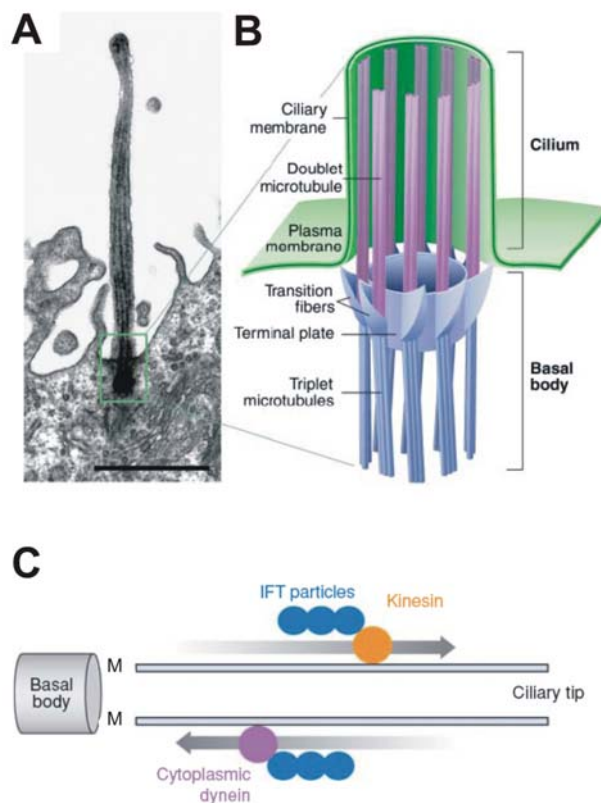
Die Expression von OMP, der ACIII und CNGA2 unterscheidet sich bei  $G_{olf}$ -defizienten Mäusen nicht von Wildtyp-Mäusen.

### 1.5 Funktion und Bedeutung des primären Ziliums

Als Zilien werden zylinderförmige Zellkompartimente bezeichnet, die aus Mikrotubuli aufgebaut sind. Man unterscheidet prinzipiell zwei Typen von Zilien: die beweglichen Kinozilien und die unbeweglichen Stereozilien (auch als primäre Zilien bezeichnet)<sup>68</sup>, die sich sowohl anatomisch als auch funktionell voneinander abgrenzen. Daneben existiert noch eine Mischform, die bisher nur in Blastozysten gefunden wurde. Hierbei handelt es sich um ein Zilium, welches anatomisch gesehen zwar den primären Zilien zuzuordnen ist, aber im Gegensatz zu diesen in geringem Ausmaß motil ist.

Im folgenden wird nur auf die nichtmotilen Stereozilien weiter eingegangen. Diese findet man in nahezu allen Zellen des Körpers. Primäre Zilien treten entweder singulär oder in Büscheln auf, in letzterem Fall spricht man auch von einem Ziliensaum. Einen solchen Ziliensaum findet man z. B. auch in ORNs. Ein einzelnes Stereozilium besteht aus neun paarig angeordneten Mikrotubuli und entwickelt sich aus dem sogenannten Basalkörperchen, einer in der Plasmamembran verankerten Struktur. Die Zilienmembran ist morphologisch gesehen eine Ausstülpung der Plasmamembran<sup>69</sup>.

Neben der Stützfunktion dienen die Mikrotubuli in erster Linie dem Transport von Partikeln entlang des Ziliums, dem sogenannten intraflagellaren Transport (IFT, auch intraziliärer Transport)<sup>70-72</sup>. Da das Zilium nicht in der Lage ist, Proteine selbst zu synthetisieren<sup>73</sup>, ist es auf diesen Transportmechanismus angewiesen. Der Ausgangspunkt für den Partikel-Transport ist das Basalkörperchen<sup>74,75</sup> und verläuft in Richtung auf die Zilienspitze hin (anterograd) mit Hilfe von Motorproteinen wie z. B. dem Kinesin-II<sup>76</sup>. Der retrograde Transport von Partikeln, also von der Zilienspitze zurück zum Basalkörperchen, verläuft über zytoplasmatisches Dynein<sup>77</sup>. Kinesin-II besteht aus zwei Motor-Untereinheiten, KIF3A und KIF3B, sowie einem weiteren Protein ohne Motorfunktion, dem sogenannten Kinesin-assoziierten Protein<sup>78</sup>.



**Abb. 1-6 A** Elektronenmikroskopische Aufnahme eines primären Ziliums aus Gliazellen des Kanarienvogels. **B** Schematische Darstellung des Basalkörperchens und des primären Ziliums (Abb. modifiziert nach Singla und Reiter 2006). **C** Schematische Darstellung des intraflagellaren Transports von Partikeln entlang der Mikrotubuli (M) zur Zilienspitze hin (anterograder IFT) durch Kinesin und zurück zum Basalkörperchen (retrograder Transport) durch Dynein (Abb. modifiziert nach Badano et al. 2006).

Die Funktion der unbeweglichen Zilien ist in den meisten Geweben noch unklar. Bisher konnte lediglich ihre Rolle als Chemo- und Mechanosensor in Nierenepithelzellen gezeigt werden. In Photorezeptoren dienen sie der Verbindung von Außen- und Innensegmenten (Übersicht zur physiologischen Rolle des primären Ziliums in Praetorius und Spring 2005<sup>79</sup> und Singla und Reiter<sup>80</sup>).

Defekte in der Zilienstruktur führen je nach betroffenem Gewebe zu verschiedenen Krankheitsbildern, die man auch unter dem Sammelbegriff „Ziliopathien“ zusammenfassen kann (Überblick in Badano et al.<sup>81</sup> und Zariwala et al.<sup>82</sup>). Beispielsweise führt ein Defekt des Motorproteins Kinesin-II in den Photorezeptoren zu einer Degeneration der Retina<sup>83</sup>. Störungen der Zilienfunktion in olfaktorischen Rezeptorneuronen äußern sich mit einem Ausfall des Geruchssinns (Anosmie)<sup>84</sup>. Auch die Ursache einer sehr häufigen Nierenerkrankung, der polycystischen Nephropathie (PKD), kann auf eine Störung der Zilienfunktion zurückgeführt werden<sup>85,86</sup>.

Die weitreichende Bedeutung des primären Ziliums wird deutlich, wenn man das sogenannte Bardet-Biedl-Syndrom (BBS) betrachtet: Patienten mit diesem Krankheitsbild leiden an Fettleibigkeit, Polydactylie, Anosmie, Retinadegeneration, mentaler Retardierung und Malformationen von Niere und Gonaden<sup>87-89</sup> (Übersicht in Blacque und Leroux 2006<sup>90</sup>). Bisher konnten elf BBS-Proteine identifiziert werden (BBS1-11), von welchen jedes einzelne in Geweben mit primärem Zilium nachgewiesen werden konnte. BBS5 beispielsweise wurde in den Basalkörperchen des Neuralrohres von Mäusen gefunden<sup>91</sup>, für BBS4 und BBS6 wurde eine Interaktion mit Proteinen des Basalkörperchens gezeigt<sup>92,93</sup>.

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Der CNG-Kanal in olfaktorischen Rezeptorneuronen besteht aus drei Untereinheiten: CNGA2, CNGA4 und CNGB1b. Während CNGA2 in heterologen Expressionssystemen einen funktionellen homomeren Kanal bilden kann, sind die beiden anderen Untereinheiten nicht dazu in der Lage. Sie können nur zusammen mit CNGA2 funktionelle Kanäle bilden, welchen sie charakteristische Eigenschaften verleihen. Man bezeichnet sie daher auch als modulatorische Untereinheiten.

Während die Funktion von CNGA2 und CNGA4 im Riechprozess *in vivo* anhand von Knockout-Mäusen aufgeklärt werden konnte<sup>59,60,63,64</sup>, existieren zur Untersuchung der Bedeutung von CNGB1b bisher nur *in vitro*-Studien an heterologen Zellsystemen. Die CNGB1KO-Maus<sup>94</sup> bietet nun die Möglichkeit, die Rolle von CNGB1b im Riechprozess im lebenden Organismus zu erforschen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Auswirkungen der CNGB1-Deletion auf das Riechvermögen im Mausmodell zu untersuchen. Im Besonderen sollte die Frage geklärt werden, ob CNGB1b-defiziente olfaktorische Rezeptorneurone mit den verbleibenden CNG-Kanaluntereinheiten CNGA2 und CNGA4 noch funktionstüchtig sind und wie die Eigenschaften des olfaktorischen CNGB1b-defizienten CNG-Kanals charakterisiert sind.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

Für die gentechnologischen Arbeiten lag eine Genehmigung der Regierung von Oberbayern vom 19.01.2000 (Aktenzeichen 821-8763.14.469/30) vor.

### 2.1 Chemikalien, Lösungen, Puffer

Sofern nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien in der Qualität „pro analysi“ oder „für molekularbiologische Zwecke“ von den Firmen Roth (Karlsruhe, Deutschland), Sigma/Fluka (Deisenhofen, Deutschland) oder VWR (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Für sämtliche Lösungen wurde Wasser aus einer EASYpure UV/UF-Anlage (Barnstead, Iowa, USA) verwendet. Sterilfiltriertes Wasser wurde durch Qualilab Spritzenvorsatzfilter (Merck, Darmstadt, Deutschland) hergestellt. Für kritische Anwendungen, wie z. B. PCRs, RNA-Arbeiten oder Zellkultur, wurde das Wasser aus der EASYpure-Anlage zusätzlich noch autoklaviert. Falls nicht gesondert angegeben, wurde für alle Zentrifugationsschritte eine Biofuge fresco von Heraeus (Hanau, Deutschland) benutzt.

#### Standardlösungen

##### PBS pH7,4

NaCl( Roth)	40g
KCl (Roth)	1g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x12H <sub>2</sub> O (Roth)	14,5g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Roth)	1,2g
H <sub>2</sub> O	ad 5000ml

##### 10x TBE

Tris (VWR)	540g
Borsäure (Roth)	275g
0,5M EDTA pH8	200ml
H <sub>2</sub> O	ad 5l

##### 4% PFA/PBS

Paraformaldehyd (Roth)	6g
PBS	ad 150ml
bei 60°C lösen, sterilfiltrieren.	
Lagern bei –20°C	

Die Zusammensetzung aller weiteren verwendeten Lösungen wird bei der jeweiligen Methode beschrieben.

## 2.2 Arbeiten mit DNS

### 2.2.1 Gewinnung und Reinigung von genomischer DNS

#### 2.2.1.1 Enzymatischer Verdau mit Proteinase K

Das zu verdauende Gewebe wurde 4h bis über Nacht bei 55°C und 600rpm in einem Thermoschüttler (Eppendorf) inkubiert. Anschließend wurde die Proteinase K durch Erhitzen auf 99°C 15 min denaturiert.

<b>Verdau-Mix</b>		<b>Proteinase K-Puffer</b>	
Proteinase K-Puffer	5µl	Tris (VWR)	100mM
Proteinase K	1µl	EDTA (Roth)	5mM
(Roth, 20mg/ml)		SDS (Roth)	0,2%
H <sub>2</sub> O <sub>PCR</sub>	ad 50µl	NaCl (Roth)	200mM

#### 2.2.1.2 Phenol-Chloroform-Fällung

Musste die DNS besonders rein sein, wurden die im Lysat enthaltenen Proteine durch eine Phenol-Chloroform-Fällung abgetrennt. Dazu wurde der Verdau-Ansatz mit dem gleichen Volumen eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1, Roth) versetzt, geschüttelt und anschließend bei 13000 rpm 5 min lang zentrifugiert. Um Reste des Phenols abzutrennen, wurde die obere Phase erneut mit dem gleichen Volumen Chloroform versetzt und nochmals geschüttelt und zentrifugiert.

#### 2.2.1.3 Elektroelution

DNS aus präparativen PAGE-Gelen wurde durch Elektroelution isoliert. Die entsprechende Bande wurde unter UV-Licht ausgeschnitten, mit 300µl autoklaviertem 1xTBE in einen Dialyseschlauch (Sigma) gegeben und unter Kühlung 3-4h bei 145mA in 1xTBE in einer horizontalen Elektrophoresekammer eluiert. Im Anschluss erfolgte eine Fällung der DNS in Ethanol.

#### 2.2.1.4 GFX-Säulen

Die Aufreinigung von DNS mittels GFX-Säulen (GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, Amersham Biosciences, Little Chalfont, England) erfolgte nach Anweisung des Herstellers. Die ausgeschnittene Bande oder das PCR-Produkt wird in einem chaotropen Puffer inkubiert und affinitätschromatographisch über eine Glasfasermatrix isoliert.

#### 2.2.1.5 Präzipitation von DNS

DNS wurde zur Aufreinigung oder Aufkonzentrierung in Ethanol gefällt. Die wässrige DNS-Lösung wurde mit 1/10 Volumen Natriumacetat 5M pH 5,2 und dem 2,5fachen Volumen Ethanol 100%

gemischt und 15 min bei  $-80^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach Fällung der DNS wurde bei 13000rpm 10min lang bei  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit Ethanol 70% gewaschen. Nach nochmaliger Zentrifugation wurde das Pellet in einer Vakuumzentrifuge (Speed-Vac, Heraeus) getrocknet und in Wasser gelöst.

## 2.2.2 Amplifikation von DNS

### 2.2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR wurde sowohl für die Amplifizierung von DNS zu Klonierungszwecken als auch zur Genotypisierung und Sequenzierung verwendet. Sofern nicht anders vermerkt, wurden alle PCRs mit dem Taq Core Kit 10 (Qbiogene) durchgeführt. Je nach Bedarf wurde das Standardprotokoll den jeweiligen Erfordernissen angepasst. Alle Primer wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert.

Sämtliche PCRs wurden in einem Thermocycler T1 der Firma Biometra durchgeführt.

#### Standardprotokoll:

#### Reaktionsansatz

Primer forward 10pmol/ $\mu\text{l}$	2,5 $\mu\text{l}$
Primer reverse 10pmol/ $\mu\text{l}$	2,5 $\mu\text{l}$
10xTaq-Puffer	5,0 $\mu\text{l}$
dNTPs	8,0 $\mu\text{l}$
Taq-Polymerase	0,5 $\mu\text{l}$
DNS	0,5-3 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O	ad 50 $\mu\text{l}$

#### Reaktionsbedingungen

Initiale Denaturierung	98 $^{\circ}\text{C}$	3min	
Denaturierung	98 $^{\circ}\text{C}$	30sec	
Annealing	je nach Primer	30sec	25-40 Zyklen
Elongation	72 $^{\circ}\text{C}$	1min/kb	
Finale Polymerisation	72 $^{\circ}\text{C}$	4min	

### 2.2.2.2 Fehlerkorrigierende PCR

Für PCRs zum Zwecke der Klonierung von Fragmenten wurde die Polymerase Phusion (Finnzymes) verwendet, welche im Gegensatz zur Taq Exonuklease-Aktivität besitzt und somit Synthesefehler erkennen und korrigieren kann. Abwandlungen der Standardbedingungen erfolgten laut Vorschrift des Herstellers.

### 2.2.2.3 Genotypisierungs-PCR

Gewebeproben der zu genotypisierenden Mäuse wurden mit Proteinase K verdaut. Für die PCR wurden je nach Mauslinie 0,5 – 3µl des Verdaus ohne weitere Aufreinigung eingesetzt und 25µl-Ansätze pipettiert.

#### Reaktionsansatz CNGB1

PSHV8F 10pmol/µl	1,25µl
PSHV6bR 10pmol/µl	1,25µl
PSHV9R 10pmol/µl	1,25µl
10xTaq-Puffer	2,5µl
dNTPs	4,0µl
Taq-Polymerase	0,25µl
DNS	3µl
H <sub>2</sub> O	ad 25µl

#### Reaktionsbedingungen CNGB1

98°C	3min	
98°C	40sec	
59°C	30sec	30 Zyklen
72°C	30sec	
72°C	5min	

10µl der PCR wurden auf einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt. Die entstehenden Fragmente sind je nach Genotyp entweder 480bp (WT) oder 415bp (CNGB1KO) lang.

Für CNGA3-Mäuse mussten für WT und KO zwei getrennte PCRs durchgeführt werden. Für den WT ergibt sich ein Amplikon mit 284bp Länge, für den KO entsteht ein 312bp langes Fragment. Auch hier wurden 10µl der PCR auf 2%ige Agarosegele aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

#### Reaktionsansatz CNGA3 WT-PCR

mCG7 10pmol/µl	1,0µl
mCG8 10pmol/µl	1,0µl
10xTaq-Puffer	2,5µl
dNTPs	4,0µl
Taq-Polymerase	0,25µl
DNS	0,5µl
H <sub>2</sub> O	ad 25µl

#### Reaktionsbedingungen CNGA3 WT

98°C	2min	
98°C	30sec	
65°C	30sec	10 Zyklen
72°C	30sec	
95°C	30sec	
55°C	30sec	30 Zyklen
72°C	30sec	
72°C	5min	

#### Reaktionsansatz CNGA3 KO-PCR

mCG19 10pmol/µl	1,0µl
Neo 10pmol/µl	1,0µl
10xTaq-Puffer	2,5µl
dNTPs	4,0µl
Taq-Polymerase	0,25µl
DNS	2,5µl
H <sub>2</sub> O	ad 25µl

#### Reaktionsbedingungen CNGA3 KO

98°C	2min	
98°C	30sec	
65°C	30sec	10 Zyklen
72°C	30sec	
95°C	30sec	
55°C	30sec	37 Zyklen
72°C	30sec	
72°C	5min	



#### 2.2.2.4 Sequenzierung

Die Analyse von DNS-Sequenzen erfolgte in einem ABI Prism™ 310 Sequenzer (PE Applied Biosystems) in Anlehnung an die Didesoxymethode von Sanger<sup>95</sup>. Nach der Reaktion mit dem Ready Reaction Mix (Big Dye) erfolgte eine kapillarelektrophoretische Auftrennung und Detektion der Fluoreszenz-markierten Kettenabbruchstücke.

#### Reaktionsansatz für Sequenzierungs-PCR

DNS	200ng	War die Konzentration der DNS nicht bekannt, wurde 1µl eingesetzt.
Primer 10pmol/µl	1µl	
Big Dye	2,5µl	
H <sub>2</sub> O	ad 12µl	

#### Reaktionsbedingungen

Initiale Denaturierung	94°C	2min	30 Zyklen
Denaturierung	94°C	30sec	
Annealing	50°C	30 sec	
Elongation	60°C	4min	

#### 2.2.3 Enzymatische Modifikation von DNS

Enzyme wurden von den Firmen New England Biolabs (NEB, Frankfurt/Main, Deutschland), Promega (Mannheim, Deutschland) oder Roche (Mannheim, Deutschland) verwendet.

##### 2.2.3.1 Restriktionsverdau

Enzymmenge, Zusammensetzung der Puffer und Reaktionsbedingungen richteten sich nach den Angaben des Herstellers.

##### 2.2.3.2 Dephosphorylierung von DNS-Fragmenten

Terminale Phosphatgruppen linearisierter Vektoren wurden mit CIP (calf intestine phosphatase, NEB) entfernt, um eine ungewollte Religation des Vektors zu verhindern. Dazu wurden 10 Einheiten CIP direkt in den Restriktionsverdau pipettiert und mind. 2h bei 37°C inkubiert.

##### 2.2.3.3 Ligation von DNS-Fragmenten

Um zwei oder mehrere DNS-Fragmente miteinander zu verknüpfen, wurde T4-DNS-Ligase eingesetzt (NEB). Der linearisierte Vektor wurde mit einem 3-4fachen Überschuss an zu integrierender DNS, ATP-haltigem T4-Ligase-Puffer und 400 Einheiten T4-DNS-Ligase über Nacht bei 16°C (Wasserbad) inkubiert.

### 2.2.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNS-Fragmenten

DNS-Fragmente wurden entweder einer horizontalen (Agarosegele) oder vertikalen (PAGE-Gele) Elektrophorese in 1x TBE unterzogen. Als Standardmarker wurde die 1Kb-Ladder (Invitrogen) verwendet. Der Auftragspuffer (6xDye) enthielt Bromphenolblau und Xylencyanol. Die Visualisierung der Fragmente erfolgte nach Interkalation von Ethidiumbromid bei 302nm mit Hilfe eines Gel Doc 2000 (BioRad).

#### Lösungen

##### 10x TBE

Tris (VWR)	540g
Borsäure (Roth)	275g
0,5M EDTA pH8	200ml
H <sub>2</sub> O	ad 5l

##### 6x Dye

Ficoll Typ 400 (Sigma)	18g
0,5M EDTA pH8	24ml
10x TBE	60ml
H <sub>2</sub> O	ad 100ml
Bromphenolblau (50µg/ml, Merck)	3ml
Xylencyanol (50µg/m, Merck)	3ml

##### Elektrophoresepuffer

1x TBE (1T 10x TBE + 9T H<sub>2</sub>O)

##### Ethidiumbromidlösung

10mg/ml Lösung in H<sub>2</sub>O, Roth

#### 2.2.4.1 Agarosegele

Je nach Fragmentgröße wurden 0,7%-3%ige Agarosegele verwendet. Die Agarose (peqGOLD Universal-Agarose, Peqlab, Erlangen, Deutschland) wurde in 1x TBE aufgekocht. Nach Abkühlung auf 50°C (Wasserbad) wurde Ethidiumbromid zugegeben (final 0,8µg/ml, Roth). Die Elektrophorese erfolgte bei 100V (präparative Gele) bis 150V (analytische Gele).

#### 2.2.4.2 PAGE-Gele

Sehr kleine Fragmente wurden auf 5%igen PAGE-Gelen aufgetrennt. Je nach Zweck wurden Gele mit einer Dicke von 0,75mm (analytische Gele) oder 1,5mm (präparative Gele) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte 10min bei 100V, gefolgt von 50min bei 260V. Anschließend wurde das Gel 10min in Ethidiumbromidlösung (0,5µg/ml) gefärbt und gewaschen.

##### 5% Polyacrylamidgel

Rotiphorese Gel 29:1(Roth)	3,75ml
10x TBE	3ml
H <sub>2</sub> O	ad 30ml
TEMED (Fluka)	20µl
APS (Roth, 20%ige Lösung in H <sub>2</sub> O)	70µl

### 2.2.5 Amplifikation und Isolierung von Plasmiden

#### 2.2.5.1 Verwendete Plasmide

##### pcDNA3.1

Dieser Expressionsvektor von Invitrogen kann zur heterologen Expression von cDNS in eukaryotischen Zellen verwendet werden. Er diente zur Expression verschiedener CNG-Kanaluntereinheiten in HEK293-Zellen.

##### pIRES-eGFP

Neben dem in die multiple cloning site integrierten Gen besitzt der bizistronische Vektor pIRES-eGFP ein Gen für das verstärkte Green Fluorescence Protein (eGFP). Die beiden Gene werden getrennt voneinander transkribiert, es entsteht also kein Fusionsprotein. Anhand der grünen Fluoreszenz kann die Effizienz der Transfektion überprüft werden. pIRES-eGFP wurde für die Expression von CNG-Untereinheiten in HEK293-Zellen eingesetzt, die anschließend geerntet und für Western Blot verwendet wurden.

#### 2.2.5.2 Kultivierung von *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli* vom Stamm XL1-Blue MRF' (Stratagene) erfolgte in glucosehaltigem Luria-Bertani-Medium (LB+), entweder in Flüssigkultur oder auf agarhaltigen Petrischalen. Zur Selektion der erfolgreich transformierten Zellen wurde jeweils dasjenige Antibiotikum zugegeben, dessen Resistenzgen sich auf dem Plasmid befand. Flüssigkulturen wurden bei 37°C und 225rpm in einem Bakterenschüttler (Certomat IS, Firma Braun), Agarplatten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Ein Teil der Flüssigkultur wurde als 1:1-Gemisch in 100%igem Glycerol bei -80°C gelagert.

##### (LB+)-Medium

Pepton (Roth)	10g
Hefeextrakt (Roth)	5g
NaCl (Roth)	5g
Glucose (Roth)	1g
H <sub>2</sub> O	ad 1000ml
pH 7,2 - 7,5	

##### (LB+)-Agar

Agar (Roth)	15g
LB+-Medium	ad 1000ml

#### 2.2.5.3 Transformation von *E. coli*

Die Transformation kompetenter *E. coli* erfolgte per Hitzeschock. 100µl Zellsuspension wurden mit 10µl Ligationsansatz 30min auf Eis inkubiert, 45sec einem Hitzeschock bei 42°C unterzogen und nochmals 2min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 900µl (LB+)-Medium wurde 1h bei 37°C und 225rpm geschüttelt, 2min bei 3500rpm abzentrifugiert, der Überstand dekantiert und der resuspendierte Rest auf Agarplatten ausplattiert.

#### 2.2.5.4 Alkalische Lyse im kleinen Maßstab (Miniprep)

Einzelne Kolonien wurden von der Agarplatte gepickt und damit 7ml (LB+)-Medium, versetzt mit dem entsprechenden Antibiotikum, angeimpft. Nach Kultivierung über Nacht bei 37°C und 225rpm erfolgte die Isolierung der Plasmid-DNS mittels alkalischer Lyse<sup>96</sup>. Für Restriktionsverdau und Sequenzierung wurde jeweils 1µl der erhaltenen DNS eingesetzt.

#### 2.2.5.5 Alkalische Lyse im Großmaßstab (Maxiprep)

Die Gewinnung von Plasmid-DNS in größerem Maßstab erfolgte ebenfalls durch alkalische Lyse unter Verwendung des PureYield™ Plasmid Midi Prep Kits (Promega). Die isolierte DNS ist aufgrund eines enthaltenen Aufreinigungsschrittes über eine Silicamembran wesentlich sauberer als DNS aus Minipräparationen. Es wurde mit 200ml-Kulturen gearbeitet.

#### 2.2.5.6 Quantifizierung von DNS

Die Konzentration von DNS-Lösungen wurde mit einem Eppendorf BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei einer Absorption von 260nm ermittelt. Die optische Dichte ( $OD_{260}$ ) von 1 entspricht bei einer Schichtdicke von 1cm einer DNS-Menge von 50µg/µl (doppelsträngige DNS).

### 2.3 Arbeiten mit RNS

Bei Arbeiten mit RNS wurde darauf geachtet, zügig und möglichst unter Vermeidung einer Kontamination mit RNAsen zu hantieren. Alle verwendeten Glaswaren, Rührfische etc. wurden zur Zerstörung von RNAsen bei 220°C mindestens 3h lang gebacken.

### 2.4 Isolierung von RNS aus Mausgewebe

Die Gewinnung von totaler RNS aus olfaktorischem Epithel erfolgt unter Verwendung des RNeasy Protect Mini Kits (Qiagen, Düsseldorf, Deutschland). Das Kit enthält mit Silicagel gefüllte Säulen, über welche die RNS affinitätschromatographisch aufgereinigt wird. Das olfaktorische Epithel wurde zügig entnommen (siehe Punkt 2.6.1) und bis zur weiteren Verwendung in 100µl RNAlater überführt. Es folgte eine Zerkleinerung mit Hilfe eines Ultra-Turrax T8 (IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland) in Lysepuffer. Die weiteren Arbeitsschritte richteten sich nach den Angaben des Herstellers. Die Bestimmung der Konzentration der RNS erfolgte wie unter Punkt 2.2.5.6 beschrieben. Die Lagerung von RNS erfolgte bei -80°C.

### 2.5 RT-PCR

Zur Synthese von cDNS wurde das SuperscriptII RT H<sup>-</sup>-Kit (Invitrogen, Carlsbad, USA) nach Angaben des Herstellers verwendet. RNS wird dabei mit Hilfe einer reversen Transkriptase in komplementäre DNS (cDNS) umgeschrieben. Für jede Reaktion wurden 10µg der isolierten RNS eingesetzt. Die PCR erfolgte unter Verwendung von Oligo-dT-Primern, die spezifisch an den Poly-A-Schwanz von Boten-RNS binden. Eventuell in der Präparation verschleppte DNS wurde vor der PCR mit DNase verdaut.

**Standardprotokoll**

RNS	10µg	
10x RT-Puffer	2µl	
25mM MgCl <sub>2</sub>	2µl	
0,1M DTT (Roth)	1µl	
DNase	0,1µl	
RNasin	1µl	
		10min, 37°C (DNS-Verdau)
		5min, 75°C (Inaktivierung der DNase)
<hr/>		
+ 1µl Oligo-dT-Primer		
		10min, 70°C (Annealing)
<hr/>		
+ 1µl 10mM dNTPs		
+ 1µl 0,1M DTT		5min, 42°C
<hr/>		
+ 1µl SuperscriptII		50min, 42°C (reverse Transkription)
		5min, 90°C (Inaktivierung der RT)
		10min, 4°C (Kühlung)
<hr/>		
+1µl RNase H		20min, 37°C (RNS-Verdau)

## 2.6 Arbeiten mit Proteinen

Arbeiten mit Proteinen wurden möglichst immer auf Eis durchgeführt, um eine Degradation der Proteine zu vermeiden.

<b><u>Proteaseinhibitoren</u></b>	<b><u>finale Konzentration</u></b>
Leupeptin (Calbiochem, Stock in 50% EtOH)	1µg/ml
Pepstatin A (Calbiochem, Stock in 50% EtOH)	1µM
Antipain (Calbiochem, Stock in 50% EtOH)	1ng/ml
PMSF (Sigma, Stock in 100% EtOH)	100nM
Orthophenanthrolin (Sigma, Stock in 100% EtOH)	1mM
Benzamidin (Sigma, Stock in H <sub>2</sub> O)	1mM
Jodacetamid (Sigma, Stock in H <sub>2</sub> O)	0,9mM

### **Roche Complete ohne EDTA**

1 Tablette in 2ml Puffer auflösen; 1:10 verdünnt einsetzen (entspricht 2,5-fach)

### ***2.6.1 Isolierung des olfaktorischen Epithels aus Mäusen***

#### **Präparation für Immunhistochemie**

Die Mäuse wurden mit Ether betäubt und mit 50ml 4%PFA in PBS (frisch hergestellt) transkardial perfundiert. Nach der Perfusion wurde der Kopf abgetrennt, um das olfaktorische Epithel zu entnehmen. Die Epithelien wurden von umgebenden Knochen und der Nasenscheidewand befreit, 1h bei RT in 4% PFA/PBS nachfixiert, 3x 10min in PBS gewaschen und anschließend zur Kryoprotektion über Nacht in 30% Sucrose/PBS gegeben. Anschließend wurde das Gewebe in einem 1:1-Gemisch aus 30% Sucrose und Einbettmedium (OCT, Sakura Finetek) geschwenkt und schließlich in OCT eingebettet. Die Lagerung der Gewebeblöcke erfolgte bei –80°C.

#### **Präparation für Western Blot**

Die Epithelien wurden ohne vorherige Perfusion der Tiere von Knochen und Nasenscheidewand befreit, aus der Nasenhöhle entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte ebenfalls bei –80°C.

#### **Präparation für Semidünnschnitte**

Das olfaktorische Epithel wurde nach Perfusion der Tiere entnommen und 45min in 2,5% Glutaraldehyd in 4%PFA/PBS bei 4°C nachfixiert. Alle weiteren Schritte erfolgten bei RT. Das Gewebe wurde entsprechend des Versuchsvorhabens in mehrere Teile zerlegt. Nach drei Waschschritten à 15min mit PBS wurde 3x 15min mit 0,1M Na-Cacodylatpuffer gewaschen und anschließend 1h in 1%OsO<sub>4</sub>/0,1M Na-Cacodylatpuffer nachfixiert. Wieder folgten drei Waschschrritte à 15min mit 0,1M Na-Cacodylatpuffer. Nach Behandlung in 30%igem und 50%igem EtOH (jeweils 15min) erfolgte eine

Blockkontrastierung in 2% Uranylacetat/70% EtOH für 1h. Das Gewebe wurde nun durch eine aufsteigende Ethanol-Aceton-Reihe dehydriert (EtOH 90% und 100%, EtOH-Aceton-Gemisch 1:1 jeweils 1x15min, Aceton 100% 3x15min). Anschließend wurde das Gewebe jeweils 15min in einem 1:1-Gemisch aus Aceton und Epon-Mix (Epon-Embedding-Medium-Kit, Fluka 45359) und reinem Epon-Mix inkubiert. Schließlich wurde frischer Epon-Mix in Förmchen (1h bei 60°C getrocknet) vorgelegt und das Gewebe darin eingebettet. Die Polymerisation erfolgte über Nacht bei 45°C und 24h bei 60°C. Die Lagerung der Kunstharzblöcke erfolgte bei RT.

#### 2,5% Glutaraldehyd/4% PFA/PBS

Glutaraldehyd (Roth)	0,5ml
H <sub>2</sub> O	2ml
8% PFA/PBS	2,5ml

vor Gebrauch sterilfiltrieren

#### 2%Uranylacetat/70% EtOH

Uranylacetat (Plano)	0,05g
H <sub>2</sub> O	750µl
EtOH 100%	1750µl

#### 0,2M Na-Cacodylatpuffer pH 7,4

Na-Cacodylat (Roth)	4,28g
H <sub>2</sub> O	100ml

pH mit 0,2N HCl einstellen, sterilfiltrieren

#### 1% OsO<sub>4</sub>/0,1M Na-Cacodylatpuffer

2% OsO<sub>4</sub> (Plano) und 0,2M Na-Cacodylatpuffer 1:1 gemischt

### **2.6.2 Isolierung des *Bulbus olfactorius* für Immunhistochemie**

Die Mäuse wurden mit 4% PFA/PBS perfundiert und der Kopf abgetrennt. Nach Eröffnung der Schädeldecke wurde das ganze Gehirn vorsichtig entnommen in gekühltem ( $\leq -40^{\circ}\text{C}$ ) Isopentan (Roth) langsam eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$ . Alternativ wurden die Riechkolben vom restlichen Gehirn abgetrennt und in OCT eingebettet (vgl. 2.3.1).

### **2.6.3 Gewinnung von Proteinen durch Lyse**

Frische oder tiefgefrorene Gewebe oder Zellen wurden mit Tx-Lysepuffer und Proteaseinhibitoren versetzt und in einem Potter (Potter S, B. Braun Biotech International) durch 10 Hübe homogenisiert. Anschließend wurde die Zellsuspension 30min bei 4°C über Kopf rolliert und bei 13000rpm 15min 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert, vermessen und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### Tx-Lysepuffer

HEPES pH 7,5	50mM
NaCl (Roth)	150mM
Glycerin (Roth)	10%
EDTA pH 8 (Sigma)	5mM
Triton X-100 (Roth)	1%



#### 2.6.4 Gewinnung von Membranproteinen aus Gewebe und Zellen

Das Gewebe oder Zellpellet wurde mit einem Potter (Potter S, B. Braun Biotech International) mit 10 Hübchen homogenisiert und 10min bei 5000g (8700rpm) und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 45-Ti-Röhrchen überführt und das Zellpellet noch zweimal demselben Procedere unterzogen. Die Mikrosomenfraktion im Überstand wurde in einer Ultrazentrifuge (Beckmann Coulter Optima™ LE-80K) 45min bei 30000rpm und 4°C pelletiert. Je nach Größe wurde das Pellet in 50-100µl Lysepuffer resuspendiert.

##### 3x Lysepuffer

MOPS (3-[N-Morpholino]propansulfonsäure (Sigma)	3,15g
Sucrose (Roth)	77g
0,5M EDTA pH 8	6ml
H <sub>2</sub> O	ad 200ml

#### 2.6.5 Anreicherung von olfaktorischen Zilien aus dem Riechepithel

Die Isolierung der olfaktorischen Zilien aus Riechneuronen erfolgte gemäß der Ultraschallmethode nach Washburn<sup>97</sup>.

##### Puffer A

Glucose (Roth)	7,5mM
KCl (Roth)	5mM
NaCl (Roth)	145mM
HEPES (Sigma)	20mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Roth)	1,6mM
MgSO <sub>4</sub> (Roth)	2mM
pH 7,4 mit NaOH einstellen, sterilfiltrieren	

##### Puffer B

Puffer A + 1mM EDTA (Sigma)

Zu allen Lösungen wurden Proteaseinhibitoren (Complete ohne EDTA 2,5-fach; Roche) zugeben. Alle Schritte erfolgten auf Eis.

Das olfaktorische Epithel wurde ohne vorherige Perfusion entnommen, in 1,5ml Puffer A gegeben und in der Lösung mit einer Schere möglichst klein geschnitten. Anschließend wurde 1mM EDTA zugegeben und 10min sachte geschüttelt (Wippe, 4°C). Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 1500g (5min, 4°C). Der Überstand (Fraktion S1) wurde in 45Ti-Röhrchen gegeben und auf Eis gelagert. Das Pellet wurde in 1,5ml Puffer B resuspendiert und einem Ultraschall von 10s unterzogen (Bandelin Sonopulse HD2200 mit MS-73 Spitze). Nach Zentrifugation bei 500g (5min, 4°C) wurde der Überstand (Fraktion S2a) ebenfalls in ein 45-Ti-Röhrchen gegeben, das Pellet erneut resuspendiert und wiederum einem Ultraschall, diesmal 40sec lang, unterzogen. Wieder wurde zentrifugiert (1500g, 5min, 4°C) und der Überstand (Fraktion S2b) in ein 45-Ti-Röhrchen überführt. Das Pellet wurde in

1,5ml Puffer B mit einem Ultraturrax zerkleinert, zentrifugiert und der Überstand (Fraktion S3) ebenfalls in ein Röhrchen gegeben. Alle Röhrchen wurden mit Lösung B auf ein Volumen von 6,5ml aufgefüllt und anschließend in der Ultrazentrifuge (Beckmann Coulter Optima™ LE-80K) bei 23500rpm für 25min bei 4°C zentrifugiert. Die erhaltenen Pellets wurden je nach Größe in 50-600µl Puffer B gelöst, aliquotiert, vermessen und bei -80°C gelagert.

### 2.6.6 Quantifizierung von Proteinen

Der Proteingehalt wurde UV-photometrisch (BioPhotometer, Eppendorf) nach Bradford<sup>98</sup> bestimmt. 5µl Probe wurden mit 95µl 0,15M NaCl und 1ml Coomassie Brilliantblau G250-Lösung versetzt, 2min bei RT stehen gelassen und bei 595nm vermessen. Zur Kalibrierung des Geräts wurde eine BSA-Standardreihe (1-30µg) vermessen.

#### Coomassie Brilliantblau G250-Lösung

Coomassie brilliant blue G250 (Sigma)	50mg
Ethanol 95%	25ml
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 85% (Sigma)	50ml
H <sub>2</sub> O	ad 500ml
Lagerung der filtrierten Lösung bei 4°C	

### 2.6.7 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Zur denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Lämmli<sup>99</sup> wurde das Mini PROTEAN 3 Elektrophoresesystem (BioRad) verwendet. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben unter Zugabe von Lämmli-Puffer bei 95°C 4min lang denaturiert. Als Größenmarker wurden 12µl des Precision Plus Protein Kaleidoscope™ Standards (BioRad) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in 1x Elektrophoresepuffer bei 100V.

#### 4x Trenngelpuffer pH 8,8

TRIS (VWR)	18,2g
SDS (Roth)	0,4g
H <sub>2</sub> O	ad 100 ml
pH mit HCl einstellen, sterilfiltrieren	

#### 4x Sammelgelpuffer pH 6,8

TRIS (VWR)	3,02g
SDS (Roth)	0,2g
H <sub>2</sub> O	ad 50 ml
pH mit HCl einstellen, sterilfiltrieren	

#### Trenngel (7%-10%)

Rotiphoresegel 30 (Roth)	3,5-7,5ml
4x TRIS-Cl/SDS pH 8,8	3,75ml
H <sub>2</sub> O	7,75-3,75ml
TEMED (Fluka)	10µl
APS (Roth, 20%ige Lösung in H <sub>2</sub> O)	30µl

#### Sammelgel

Rotiphoresegel 30 (Roth)	0,65ml
4x TRIS-Cl/SDS pH 6,8	1,25ml
H <sub>2</sub> O	3,05ml
TEMED (Fluka)	5µl
APS (Roth, 20%ige Lösung in H <sub>2</sub> O)	25µl

**6x Lämmli-Probenpuffer**

4x Sammelgelpuffer pH6,8	7ml
Glycerol (Roth)	3ml
SDS (Roth)	1g
Bromphenolblau (Merck)	0,004%
H <sub>2</sub> O	ad 10ml
Lagerung bei -20°C	

**Transferpuffer**

MeOH 100%	200ml
10x Elektrophoresepuffer	100ml
H <sub>2</sub> O	ad 1000ml

**10x TBS pH 8**

Tris	12,1g
NaCl	80,23g
H <sub>2</sub> O	ad 1000ml

**10x Elektrophoresepuffer**

Tris (VWR)	30,2g
Glycin (Roth)	144,0g
SDS (Roth)	10,0g
H <sub>2</sub> O	ad 1000ml

**TBST**

0,1% Tween 20 (Sigma) in 1x TBS

**Blockierlösung**

5% Milchpulver (Fluka) in 1x TBST

**Inkubationslösung**

1% Milchpulver (Fluka) in 1x TBST

**2.6.8 Western Blot**

Zur Fixierung der aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran wurde ein Tank-Blot System (Mini Trans Blot, BioRad) verwendet. Die PVDF-Membran (Porengröße 0,45µm, Immobilon, Millipore) wurde vor Gebrauch 1min in MeOH 100% hydrophilisiert und anschließend 5min in Transferpuffer äquilibriert. Geblottet wurde in Transferpuffer unter Eiskühlung bei 300mA für 45min. Nach dem Transfer wurde die Membran 1-2h Stunden bei RT getrocknet und anschließend 30min bei RT in Blockierlösung geschwenkt. Inkubation mit dem entsprechenden Primärantikörper erfolgte bei 4°C über Nacht auf einem horizontalen Rollierer (VWR). Am nächsten Tag wurde die Membran 3x 5min in TBST gewaschen, 45min bei RT mit Sekundärantikörper inkubiert und erneut 3x 5min gewaschen. Anschließend erfolgte die Detektion mit dem ECL<sup>TM</sup> System (Amersham Biosciences) auf Hyperfilm ECL<sup>TM</sup>-Filmen (Amersham Biosciences).

**2.6.9 Co-Immunpräzipitation**

Protein A Sepharose Beads (Protein A Sepharose<sup>TM</sup> Fast Flow, Amersham Biosciences, 17-1279-03) wurden 4-5x mit PBS gewaschen, bevor sie für Co-Immunpräzipitation eingesetzt wurden. Pro Ansatz wurden 20µg gewaschene Beads 2h bei 4°C mit 10µl CNGA2-Antikörper (bzw. anti-PAK als Negativkontrolle) inkubiert und anschließend 4-5x mit AM0-Puffer gewaschen. 210µg einer Zilienpräparation (Fraktion S1) wurden mit Proteaseinhibitoren (Complete ohne EDTA, Roche, 2,5-fach) versetzt und nach Zugabe von 10µg Beads 30min bei 4°C inkubiert, um unspezifisch bindende Proteine aus der Präparation abzutrennen. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und zusammen mit den Antikörper-beladenen Beads über Nacht bei 4°C über Kopf rolliert. Nach 4-5

Waschschritten mit AM300 wurden die Beads in 30µl AM0-Puffer resuspendiert. Denaturierung, Elektrophorese und Western Blot erfolgten wie in 2.6.7 und 2.6.8 beschrieben.

#### **AMX-Puffer**

Tris-HCl pH 9 (Roth)	20 mM
MgCl <sub>2</sub> (Roth)	5 mM
EDTA (Sigma)	0,2 mM
DTE (Sigma)	x mM
Glycerin (Roth)	20%

### **2.6.10 Histologie**

#### *2.6.10.1 Anfertigung von Kryoschnitten*

Gewebe für Kryoschnitte wurde wie unter Punkt 2.6.1 beschrieben präpariert und in OCT eingebettet. Die Anfertigung der Schnitte erfolgte in einem Kryotom HM-500 (Microm). Bei –25°C (Bulbus olfactorius) bis –30°C (olfaktorisches Epithel) wurden 12µm dicke serielle Schnitte angefertigt, die auf Objektträger (Superfrost Plus, Roth) aufgeschmolzen, bei RT getrocknet und anschließend bei –30°C gelagert wurden.

#### *2.6.10.2 Nissl-Färbung*

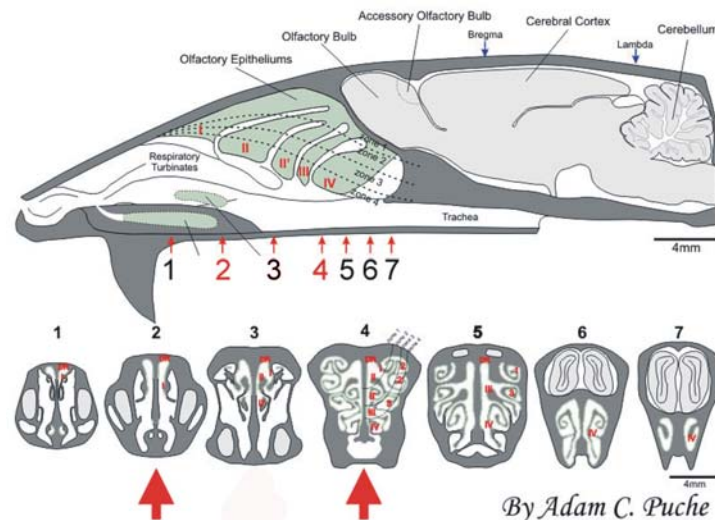
Zur Beurteilung von Schnittebene und Qualität des eingebetteten Gewebes wurden einzelne Gefrierschnitte mit dem Nissl-Reagenz gefärbt. Angefärbt werden Zellkerne und sogenannte Nisslsubstanz. Die Objektträger wurden 10sec in Nissl-Reagenz, 10sec in 70%igen EtOH und 30sec in 100%igen EtOH getaucht und in Roti-Histoclear (Roth) eingedeckelt.

#### **Nissl-Reagenz**

Kresylviolett (Fluka)	1g
Essigsäure konz. (VWR)	250µl
H <sub>2</sub> O	ad 100ml

#### *2.6.10.3 Vermessung der Epitheldicke an Kryoschnitten*

Koronare Gefrierschnitte von olfaktorischem Epithel wurden mit Nissl-Reagenz gefärbt, bei 400-facher Vergrößerung an einem Zeiss Axioskop 2 mit HMRC-Kamera fotografiert und mit Hilfe des Axiovision measurement tools (Zeiss) vermessen. Dazu wurde die Epitheldicke auf beiden Seiten der Nasenscheidewand an zwei Punkten vermessen. Zone A befand sich genau nach dem hinteren Ende des Vomeronasalorgans, Zone C befand sich 400µm hinter Zone A (vgl. Abb. 2-1). Von jedem Tier wurden für beide Positionen jeweils 3 aufeinanderfolgende Schnitte vermessen und die Werte gemittelt.



**Abb. 2-1** Zur Ermittlung der Epitheldicke wurde an zwei Punkten gemessen, einmal in Zone A (entspricht etwa Punkt 2 im Bild) und einmal in Zone C (entspricht Punkt 4 im Bild).

#### 2.6.10.4 Höchst-Färbung

Zellkerne wurden durch Anfärbung mit einer wässrigen Höchst-Lösung (5µg/ml, Hoechst 33342, Molecular Probes) visualisiert. Dazu wurde ein Tropfen Höchst-Lösung 5min bei RT auf den Gefrierschnitt gegeben, anschließend mit PBS gewaschen und das Signal im Fluoreszenzmikroskop detektiert.

#### 2.6.10.5 Anfertigung von Semidünnschnitten

Gewebe für Semi- und Ultradünnschnitte wurde wie unter Punkt 2.6.1 beschrieben in Kunstharz eingebettet. Mit Hilfe eines Knife Makers 7800 (LKB) wurden Glasmesser hergestellt und an einem Ultramikrotom OmU3 (Reichert) ca. 200nm dicke Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden mit einer Nickel-Drahtschlinge auf einen Objektträger aufgebracht und das anhaftende Wasser bei 60°C auf einer Heizplatte verdampft.

#### 2.6.10.6 Färbung von Semidünnschnitten

Semidünnschnitte wurden mit Toluidinblau angefärbt. Ein Tropfen der Färbelösung wurde auf den Schnitt aufgebracht und 30sec bei 60°C auf der Heizplatte belassen. Anschließend wurde der Objektträger gründlich mit destilliertem Wasser abgespült und in Roti-Histoclear (Roth) eingedeckelt.

#### Toluidinblau-Färbelösung

0,25g Na-Borat (Roth) mit 25ml Aqua dest mischen.

0,25g Toluidin Blau O Pulver (Fluka) zugeben und über Nacht absetzen lassen.

Bei RT lagern.

### 2.6.11 Immunhistochemie

Die Kryoschnitte wurden auf RT gebracht und das Gewebe mit einem Fettstift (PAP-Pen liquid blocker, SCI Science Services) umrandet. Nach 10min Fixierung mit 4% PFA/PBS bei RT folgten 3 Waschschr tte   15min mit PBS. Das Gewebe wurde anschließend für 4-6h bei RT mit Blockierlösung inkubiert, zum einen, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, zum anderen, um das Gewebe zu permeabilisieren. Die Blockierlösung wurde abgeschüttet und das Gewebe über Nacht bei RT mit Antikörperlösung inkubiert. Es folgten drei Waschschr tte   15min mit Waschlösung, danach wurde 1h bei RT mit fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper in Waschlösung inkubiert. Nach drei weiteren Waschschr tten mit PBS folgten H chstf rbung (siehe 2.6.10.4) und Eindeckeln in Permafluor Aqueous Mounting Medium (Beckmann Coulter). Alternativ konnte statt eines fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers ein biotinylierter Antikörper verwendet werden, der ebenfalls 45min auf den Schnitten belassen wurde. Anschließend musste hier nach drei Waschschr tten mit Waschlösung eine Inkubation mit DY-547 Streptavidin erfolgen (45min RT). Waren die Primärantikörper fluoreszenzmarkiert, konnte direkt nach dem Waschen eingedekelt werden. Die Auswertung der Experimente erfolgte epifluoreszenz- bzw. konfokalmikroskopisch.

#### Blockierlösung

10% NGS (Vector)  
0,5% TritonX-100 (Roth)  
in PBS

#### Antikörper-Lösung

5% NGS (Vector)  
0,25% TritonX-100  
in PBS

#### Waschlösung

2% NGS in PBS

War der Primärantikörper gegen Ziege gerichtet, wurde in allen Lösungen NGS durch die gleiche Menge NCS (Normal Chicken Serum, Vector) ausgetauscht.

### 2.6.12 Mikroskopie

#### 2.6.12.1 Epifluoreszenzmikroskopie

Zur Detektion der fluoreszenzmarkierten Antikörper wurde ein Axioskop 2 mit HMRC-Kamera (Zeiss, Jena, Deutschland) unter Verwendung folgender Filter benutzt:

Fluorophor	Filterset (Nummer)	Anregung	Strahlenteiler	Emission
Höchst	01 (488001-0000)	BP 365/12	FT 395	LP 397
FITC, Cy2	10 (488010-0000)	BP 450-490	FT 510	LP 515-565
	38 (1031-350)	BP 470/40	BP 525/50	LP 590
Texas Red, DY-547, SA-547	15 (488015-0000)	BP 546/12	FT 580	LP 590

Für genauere Auswertungen wurde ein Laser-Konfokalmikroskop verwendet.

### 2.6.12.2 Laser-Konfokalmikroskopie

Die Auswertung der immunhistochemischen Experimente erfolgte an einem Laser-Konfokalmikroskop der Firma Zeiss (LSM 510).

Folgende Laser wurden eingesetzt:

<b>Fluorophor</b>	<b>Laser</b>	
Höchst	UV	351nm
FITC, Cy2	Argon2	488nm
DY-547, Cy3	HeNe/1	543nm
DY-631	HeNe/2	633nm

### 2.6.13 Aufreinigung von Antikörpern

Zur spezifischen Detektion des murinen CNGA2- und CNGA4-Kanalproteins wurden polyklonale Antikörper hergestellt. Die Antikörper waren gegen den C-Terminus des jeweiligen Kanalproteins gerichtet. Synthese der Peptide (C-AbmCNGA2: CKQNHEDDYLSDGINTPE, C-AbmA4: CREWPMPDDMGEADDEAE) und Immunisierung der Tiere (C-AbmCNGA2: Kaninchen, C-AbmCNGA4: Meerschweinchen) erfolgte durch die Firma Gramsch (Schwabhausen, Deutschland).

Die Aufreinigung der Antikörper aus Serum erfolgte mit dem Sulfo Link Kit (Pierce) nach Vorschrift des Herstellers über Affinitätssäulen. Das entsprechende Peptid wurde dazu an eine Säule gekoppelt und der Antikörper aus dem Serum daran gebunden. Nach einigen Waschschritten erfolgte dann die Elution des Antikörpers.

### 2.6.14 Fluoreszenzmarkierung von Antikörpern

Um in immunhistochemischen Untersuchungen auf die Verwendung eines Sekundärantikörpers verzichten zu können bzw. um eine Mehrfachmarkierung mit Antikörpern aus der gleichen Spezies durchführen zu können, wurden einige Antikörper (C-AbmCNGB1, C-AbmCNGA3 und anti-ACIII) mit fluoreszierenden NHS-Estern der Firma Dyomics markiert. Die Ester (DY-547 und DY-631) wurden in wasserfreiem DMSO gelöst (10mg/ml). Microcon YM-30-Säulchen (Millipore) wurden verwendet, um 50µg Antikörperlösung von enthaltenem Natriumazid und Salzen zu befreien und aufzukonzentrieren. Dazu wurden 250µl Natriumbicarbonat-Puffer zur Antikörperlösung gegeben und auf die Säulchen aufgetragen. Nach 15min Zentrifugation bei 13000rpm und 4°C konnte der Antikörper-haltige Überstand nach Umdrehen der Säule bei 3500rpm (3min 4°C) in frische Caps abzentrifugiert werden. Pro mg Antikörper wurde 1µl NHS-Esterlösung zugesetzt und der Ansatz 1h unter Lichtschutz bei RT geschüttelt. Die Aufreinigung erfolgte nach Verdünnung mit PBS ad 300µl wieder über eine Microcon-Säule. Erneut wurde 15 min bei 4°C mit 13000rpm zentrifugiert. Durch Umdrehen der Säule wurde die fluoreszenzmarkierte Antikörperlösung in frische Caps abzentrifugiert. Nach Zugabe von BSA (finale Konzentration 1mg/ml) und NaN<sub>3</sub> (0,05%, Roth) wurde der Antikörper bei 4°C gelagert.

## 2.7 Kultur eukaryotischer Zellen

Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einer Laminar Air Flow (Hera safe HS18, Heraeus) durchgeführt. Medien und Zusätze wurden vor Gebrauch auf 37°C erwärmt.

### 2.7.1 Kultur von HEK293-Zellen

Die HEK293-Zelllinie (HEK: human embryonic kidney, Zellen immortalisiert durch Adenovirus Typ5<sup>100</sup>, ATCC Nr. CRL1573) wurde zur heterologen Expression von CNG-Kanälen verwendet. Die Zellen wurden in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM mit 1000mg/l D-Glucose, GlutaMAX<sup>TM</sup> und Natriumpyruvat, Gibco) unter Zusatz von 10% FBS (Biochrom) und Antibiotika (100U/ml Penicillin G, Biochrom, und 100µg/ml Streptomycin, Biochrom) kultiviert. Die Kultur erfolgte bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub> in 75cm<sup>2</sup>-Flaschen (Sarstedt). Alle 2-3 Tage wurden die Zellen gesplittet. Dazu wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen, mit einer EDTA-Trypsin-Lösung (0,05% Trypsin, 0,02% EDTA) abgelöst, in DMEM resuspendiert und mit einer Pipette vereinzelt. 10% der Zellen wurden in eine neue Flasche überführt und weiterkultiviert.

#### 0,05% Trypsin/0,02% EDTA

Stocklösung (0,5% Trypsin/0,2% EDTA, Biochrom)	10ml
PBS	ad 100ml

### 2.7.2 Transfektion von HEK293-Zellen

#### Transfektion mit Fugene

Einschleusung von cDNS in HEK293-Zellen über Lipofektion erfolgte mit Hilfe von Fugene 6 (Roche) nach den Anweisungen des Herstellers. Das Verhältnis von DNS (µg) zu Fugene 6 (µl) betrug 1:3. Die Reaktion erfolgte im 10-fachen Volumen (bezogen auf das Fugene-Volumen) DMEM ohne Zusätze.

#### Transfektion mit Calciumphosphat

Die Zellen wurden auf 10cm-Platten kultiviert und nach Erreichen einer 80%igen Konfluenz mit der Calciumphosphat-Methode transfiziert. Pro Platte wurden 20µg Plasmid-DNS mit H<sub>2</sub>O ad 400µl verdünnt, 100µl CaCl<sub>2</sub> 2,5M zugegeben und 2min inkubiert. Anschließend wurden tropfenweise 500µl 2x BBS zugegeben und 15min bei RT stehen gelassen. Der Reaktionsansatz wurde direkt in das Medium gegeben und durch Schwenken verteilt. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C und 3% CO<sub>2</sub> inkubiert, am nächsten Morgen mit PBS gewaschen und bis zur Ernte bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub> weiterkultiviert. Die Zellen wurden 48h nach der Transfektion geerntet; dazu wurden sie mit PBS gewaschen, mit einem Gummispatel von der Schale geschabt und 10min bei 1500rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.



**2,5M CaCl<sub>2</sub>**

CaCl <sub>2</sub> (Sigma)	7,35g
H <sub>2</sub> O	ad 20ml

**2x BBS (BES-buffered solution) pH 6,95**

BES (N,N-Bis-(2-hydroxyethyl)-2-amino-ethansulfonsäure)	0,533g
NaCl	0,818g
NaHPO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O	0,013g
H <sub>2</sub> O	ad 50ml
pH mit NaOH einstellen	

**2.8 Verwendete Mauslinien**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Mauslinien verwendet, zum einen CNGB1-defiziente Mäuse<sup>94</sup>, zum anderen CNGA3-defiziente Mäuse<sup>101</sup>. CNGB1/A3-Doppel-KO-Mäuse wurden durch Kreuzung der beiden Linien erhalten.

**2.9 Zucht und Haltung genetisch veränderter Mäuse**

Die Maushaltung erfolgte gemäß den gesetzlichen Richtlinien. Die Mäuse erhielten Wasser und Futter (Ssniff, Haltungsfutter Ratte/Maus) ad libitum. Sofern nicht anders angegeben, wurden sie einem 12h:12h Hell-Dunkel-Zyklus ausgesetzt. Alle Tiere entstammten Zuchten mit gemischtem genetischen Hintergrund aus C57/Bl6N und 129SvJ-Mäusen. Jungtiere wurden bis zur 3. (WT und A3KO sowie alle HZ-Tiere) bzw. 4. (B1KO) Lebenswoche bei der Mutter belassen. Verpaarung der Mäuse erfolgte ab einem Alter von 6 Wochen. Für alle Versuche wurden Tiere aus HZxHZ-Verpaarungen verwendet (Ausnahme: CNGB1/A3-Doppel-KO; hier existierten nur CNGB1KO/A3KOxCNGB1KO/A3KO-Zuchten).

**2.10 Verhaltenstests*****2.10.1 Open Field Test***

Der Open Field Test wurde in einem TSE Fear Conditioning System (TSE Systems) durchgeführt. Der Hell-Dunkel-Rhythmus wurde umgedreht, so dass die Mäuse während ihrer aktiven Phase getestet werden konnten. Der Test fand in einer abgedunkelten Kammer (25x25x25cm) statt. Nach einer Gewöhnung an den neuen Hell-Dunkel-Rhythmus wurde jede Maus an zwei aufeinanderfolgenden Tagen jeweils 10min lang in die Kammer gesetzt, wo alle Aktionen und Bewegungen der Maus registriert und aufgezeichnet wurden. Nach jeder Maus wurde die Kammer gründlich mit Ethanol abgesprüht, um Geruchsspuren zu vermeiden. Ausgewertet wurden die Aktivitäts-Parameter zurückgelegte Wegstrecke (m), Geschwindigkeit (cm/s) und Anzahl der Aufrichtungen sowie der bevorzugte Aufenthaltsort (peripher oder zentral) und die erforschte Fläche.

### **2.10.2 Riechtest**

Einzel gehaltenen Mäuse erhielten über Nacht (18h lang) kein Futter, Wasser stand weiterhin ad libitum zur Verfügung. Nachdem ein Futterpellet (#V1534, 25x10mm, Ssniff) 3cm tief zentral im Käfig unter dem Streu vergraben wurde, wurde die Maus zurück in den Käfig gesetzt und die Zeit gemessen, die verging, bis die Maus das Futterpellet aufgefunden hatte. War die Suche nach 10min erfolglos, wurde das Experiment abgebrochen.

### **2.11 Hemmung des Proteasoms**

Mäuse im Alter von 4 Wochen wurden mit einer Lösung des zellgängigen Proteasom-Inhibitors Carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal (MG132, Calbiochem)<sup>102</sup> intraperitoneal injiziert (10µg/g Körpergewicht) und nach 20h Inkubationszeit mit 4% PFA/PBS perfundiert. Es folgte die Isolation des olfaktorischen Epithels wie unter Punkt 2.6.1 beschrieben. Eine zweite Gruppe erhielt nach 24h Inkubationszeit eine weitere Dosis des Inhibitors (wieder 10µg/g Körpergewicht). Wiederum wurden die Mäuse nach 20h Inkubation perfundiert und präpariert.

### **2.12 Induktion von Fos im Bulbus olfactorius**

Die Mäuse wurden in geschlossene Plastik Käfige (IVC, Techniplast) gesetzt, die zunächst 30min lang mit Frischluft durchströmt wurden (3l/min). Danach wurden die Tiere mit Henkel 100-gesättigter Luft (Henkel 100, Henkel<sup>103,104</sup>) beduftet (3l/min), wobei nach 2min Duft jeweils 3min Frischluft ohne Duft folgten, um Adaptationseffekte zu minimieren. Insgesamt wurden 7 Duft-Intervalle appliziert. Kontrolltiere erhielten 32min lang frische Luft. 2h nach der Duft-Exposition wurden die Bulbi olfactorii wie unter Punkt 2.6.2 beschrieben isoliert und 12µm serielle Kryoschnitte angefertigt. Es folgte der immunhistochemische Nachweis des Proteins Fos mit Hilfe eines Antikörpers gegen Fos und des Vectastain ABC- (Vector, Burlingame, USA) und Nickel-DAB-Substrat-Kits (Vector, es wurden jeweils die Angaben des Herstellers befolgt).

### **2.13 Aufnahme von Elektroolfaktogrammen**

Die Aufnahme von Elektroolfaktogrammen wurde von Herrn Dr. Christian Wetzel und Herrn Wilhelm Grabowski am Lehrstuhl für Zellphysiologie an der Ruhr-Universität Bochum wie in der Literatur beschrieben<sup>103</sup> durchgeführt. Das olfaktorische Epithel von WT- und CNGB1KO-Mäusen wurde freigelegt und ein komplexes Gemisch aus Düften (Henkel 100), Firma Henkel) appliziert. Das induzierte Potential wurde mit Elektroden abgeleitet, verstärkt und aufgezeichnet. Die erhaltenen Olfaktogramme wurden eingescannt und mit Hilfe des Axiovision measurement tools (Zeiss) digitalisiert. Es wurde die Zeitverzögerung vom Einsetzen der Duftantwort (onset) bis zu dessen Amplitude (time to peak) sowie die Kinetik des Abklingens (recovery) der Antwort analysiert.

## 2.14 Calcium Imaging

Herr Dr. Marc Spehr, Lehrstuhl für Zellphysiologie an der Ruhr-Universität Bochum, führte die Versuche zum Calcium Imaging wie in Spehr et al. beschrieben<sup>103</sup> durch. Frisch dissoziierte ORNs wurden 45min lang bei RT mit dem Calcium-sensitiven Farbstoff Fura-2 beladen, gewaschen und mikroskopiert. Mit Forskolin oder Henkel 100 wurden die Zellen stimuliert (5s-Pulse, Intervalle zwischen den Stimuli 80-150s) und die Zunahme der Fluoreszenz gemessen.

## 2.15 Elektrophysiologie

Die elektrophysiologischen Messungen an isolierten olfaktorischen Rezeptorneuronen wurden von Herrn Dr. Johannes Reisert und Herrn Dr. Jonathan Bradley im Department of Neuroscience an der Johns-Hopkins University Baltimore wie in Reisert et al. beschrieben durchgeführt<sup>105,106</sup>. Es wurde an excised Patches (aus der Zelle gerissene Membranflecke) im inside out Modus (Innenseite der Zellmembran kommt in Kontakt mit der Badlösung) gemessen. Elektrophysiologische Untersuchungen an HEK293-Zellen erfolgten durch Herrn PD Dr. Xiangang Zong<sup>30,12</sup>.

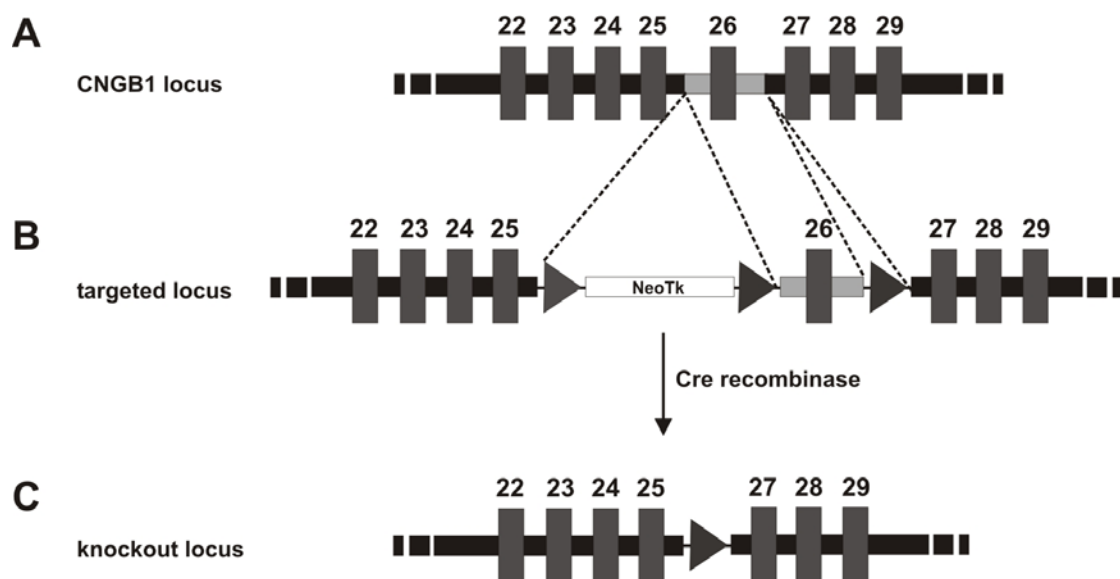
## 2.16 Statistik

Alle Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM, standard error of the mean) angegeben. Sofern nicht anders vermerkt, wurden die Daten über einen unpaired t-test ausgewertet. Statistische Signifikanz wurde ab einem Wert von  $p < 0,05$  angenommen.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Expression von CNGB1b

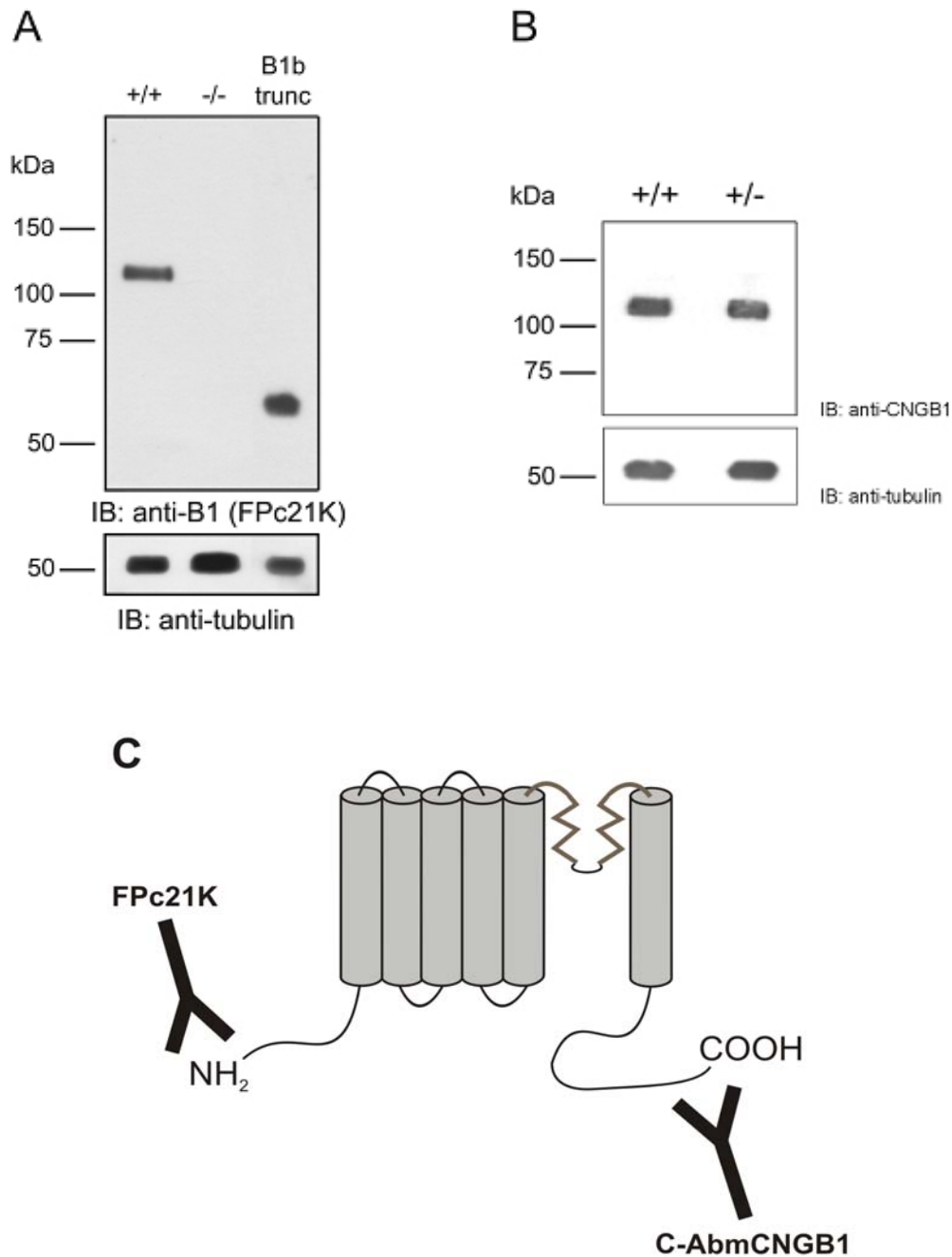
Zur Deletion von CNGB1 wurde Exon 26 im Mausgenom durch homologe Rekombination mit Hilfe des Cre/loxP-Systems entfernt<sup>94</sup>. Dieses Exon codiert für die Pore und das sechste Transmembransegment. Es besteht nun theoretisch die Möglichkeit, dass eine trunkierte Variante der CNGB1-Untereinheit, welche keine Pore und keine CNBD enthält, exprimiert wird.



**Abb. 3-1.1** Strategie zur Deletion von CNGB1 mit Hilfe des Cre/loxP-Systems. Exons sind durch graue Boxen dargestellt, der deletierte Genabschnitt ist hellgrau unterlegt. Dreiecke symbolisieren loxP-Seiten. **A** CNGB1-Locus; Exon 26 codiert für die Pore und das sechste Transmembransegment. **B** Exon 26 wird von zwei loxP-Seiten flankiert. Zur Selektion wurde eine Resistenzkassette mit Neomycinresistenzgen und Thymidinkinasegen eingefügt (weiße Box). **C** Nach Cre-vermittelter Rekombination resultiert der KO-Locus, dem Exon 26 fehlt. Unmittelbar vor Exon 27 entsteht durch eine Leserahmenverschiebung ein Stop-Codon.

Um sicherzustellen, dass die gendefizienten Tiere keinen solchen trunkierten Kanal exprimierten, wurde eine Western Blot Analyse mit einem Antikörper gegen den N-Terminus des CNGB1-Kanals (FPc21K) durchgeführt (Abb. 3-1.2A). Verwendet wurden Membranpräparationen von WT- und CNGB1KO-Tieren, in denen Proteine aus olfaktorischen Zilien angereichert waren (Fraktion S1). Als Kontrolle wurde der trunkierte Kanal in HEK293-Zellen exprimiert und die geernteten Membranproteine mit auf das SDS-Gel aufgetragen. Wie erwartet konnte in KO-Tieren kein CNGB1-Protein nachgewiesen werden. In immunhistochemischen Experimenten mit dem gleichen Antikörper konnte dieser Sachverhalt bestätigt werden (nicht gezeigt).

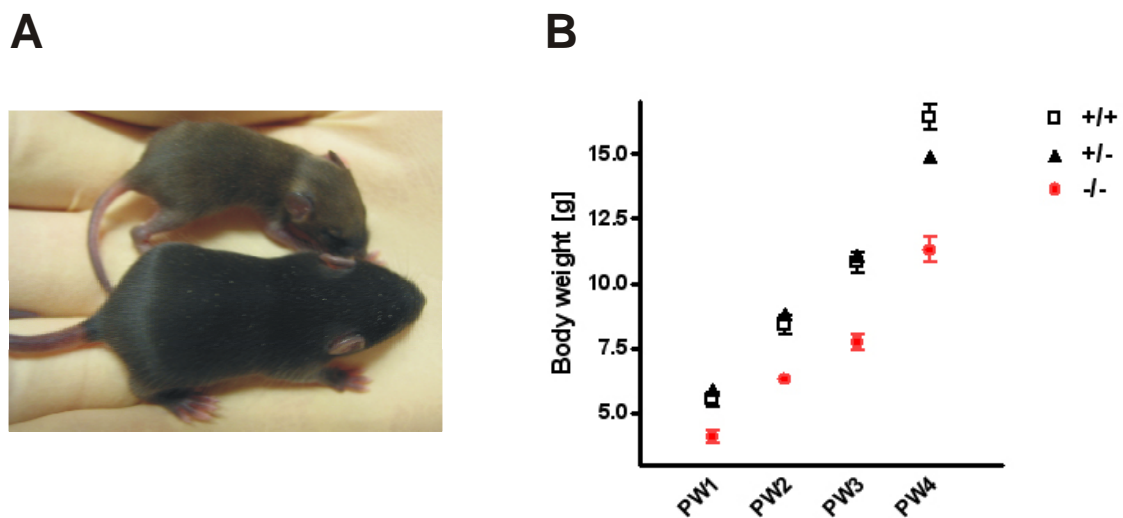
Um die Expression des CNGB1-Kanals in heterozygoten Tieren zu untersuchen, wurden Membranpräparationen von olfaktorischem Epithel von CNGB1HZ- und WT-Mäusen einer SDS-Gelelektrophorese unterworfen und per Western Blot analysiert (Antikörper: C-AbmCNGB1). Es zeigte sich, dass die Menge des Kanalproteins bei beiden Tiergruppen vergleichbar war (Abb. 3-1.2B).



**Abb. 3-1.2** Expression von CNGB1b in heterozygoten, Wildtyp- und Knockout-Mäusen. **A** In CNGB1KO-Tieren kann kein CNGB1-Protein nachgewiesen werden. Auch eine hypothetisch mögliche trunkierte Variante des Kanals wird nicht exprimiert. **B** Die Expression von CNGB1b (120kDa) ist in WT- und HZ-Tieren ähnlich stark. Als Ladekontrolle wurde jeweils Tubulin (55kDa) nachgewiesen. (+/+ : WT, +/- : CNGB1HZ, -/- : CNGB1KO, B1b trunc: trunkierter Kanal in HEK293-Zellen.) **C** Schematische Darstellung der Angriffspunkte von FPc21K und C-AbmCNGB1 am CNGB1-Kanal.

### 3.2 Vermindertes Körpergewicht bei CNGB1KO-Mäusen

Im Rahmen der Zucht der CNGB1KO-Mäuse war aufgefallen, dass die gendefizienten Tiere wesentlich kleiner waren als ihre WT-Geschwister. Zudem waren die sogenannten Milchflecken (durchscheinende Muttermilch im Magen der Tiere) bei den transgenen Mäusen kleiner, was darauf schließen ließ, dass diese Mäuse weniger Nahrung aufnahmen als die WT-Tiere. Im Vergleich zu WT- und HZ- Tieren aus dem gleichen Wurf zeigten CNGB1KO-Tiere ein deutlich verringertes Körpergewicht, welches schon ohne Hilfsmittel durch reines Betrachten der Tiere ins Auge fiel (Abb. 3-2A). Im Alter von 4 Wochen waren die KO-Tiere im Schnitt 30% leichter als die Vergleichstiere (WT:  $16,4 \pm 0,5\text{g}$ ,  $n=21$ , HZ:  $15,3 \pm 0,3\text{g}$ ,  $n=68$ , KO:  $11,3 \pm 0,5\text{g}$ ,  $n=34$ ,  $p<0,0001$ , Abb. 3-2B). Zwischen männlichen und weiblichen Mäusen konnte kein Unterschied festgestellt werden.



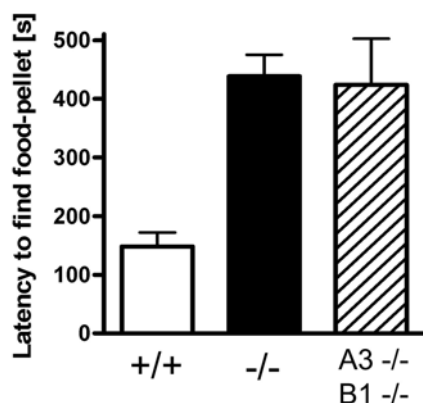
**Abb. 3-2** Vermindertes Körpergewicht von CNGB1KO-Mäusen. **A** CNGB1KO-Mäuse können durch ihre reduzierte Körpergröße von gleichaltrigen WT-Geschwistertieren unterschieden werden (oben KO, unten WT, Tiere 8 Tage alt; Foto: S. Hüttl). **B** Im Vergleich zu Kontrolltieren zeigen sie ein deutlich verringertes Körpergewicht (offene Quadrate: WT, Dreiecke: CNGB1HZ, rote Quadrate: CNGB1KO, Daten von Männchen und Weibchen wurden zusammen ausgewertet) bis ins Erwachsenenalter hinein.

Da die Fähigkeit neugeborener Mäuse, die Zitzen der Mutter zu finden und daran zu saugen, vom Riechvermögen abhängt<sup>107-109</sup>, war zu vermuten, dass die CNGB1KO-Mäuse hier ein Defizit hatten. Um diesen Sachverhalt zu klären, wurde ein Riechtest durchgeführt.

### 3.3 CNGB1KO-Mäuse zeigen eingeschränktes Riechvermögen

Für den Riechtest erhielten die Mäuse über Nacht kein Futter. Am nächsten Tag wurde ein Futterpellet zentral im Streu vergraben und die Zeit gemessen, die verging, bis die Maus das Pellet gefunden hatte. Es zeigte sich, dass die CNGB1-defizienten Mäuse zwar in der Lage waren, das vergrabene Futterpellet zu lokalisieren, jedoch benötigten sie dazu im Schnitt knapp dreimal länger als die Kontrolltiere (WT:  $148,4 \pm 23,4\text{sec}$ ,  $n=17$ , CNGB1KO:  $438,4 \pm 36,3\text{sec}$ ,  $n=28$ ,  $p<0,0001$ , Abb. 3-3).

Um zu überprüfen, ob die Fähigkeit zum Riechen durch CNGA3-exprimierende Neuronen (der Signalweg verläuft hier über cGMP, siehe Einleitung) verliehen wurde, wurden neben den CNGB1KO-Mäusen auch Doppel-KO-Mäuse, sowohl defizient für das CNGB1- als auch das CNGA3-Gen, getestet. Da diese Mäuse sich genauso verhielten wie die CNGB1KO-Tiere ( $423,9 \pm 78,8\text{s}$ , n.s.), konnte diese Möglichkeit allerdings ausgeschlossen werden. Die verbleibende Riechfunktion der CNGB1-defizienten Mäuse ist also auf eine Antwort der cAMP-exprimierenden ORNs zurückzuführen.



**Abb. 3-3** Sowohl CNGB1KO- als auch CNGB1/A3-Doppel-KO-Tiere sind in der Lage, ein verstecktes Futterpellet aufzufinden. KO-Tiere beider gendefizienter Linien benötigen dazu allerdings wesentlich mehr Zeit als die Kontrolltiere. (+/+ : WT, -/- : CNGB1KO, A3-/-B1-/- : Doppel-KO)

Eine Möglichkeit für das schlechte Abschneiden der CNGB1-defizienten Tiere im Riechtest wäre, dass die Tiere allgemein eine geringere Grundaktivität und reduziertes lokomotorisches Verhalten zeigen als WT-Mäuse. Möglich wäre auch, dass sich erkundete Fläche und bevorzugter Aufenthaltsort der beiden Mauslinien grundsätzlich voneinander unterscheiden und das Futterpellet an einer Stelle vergraben worden war, die von den transgenen Mäusen nur selten oder gar nicht besucht wurde. Der Open Field Test sollte hierüber Klarheit verschaffen.

### 3.4 Das explorative Verhalten der CNGB1KO-Mäuse unterscheidet sich nicht von WT-Mäusen

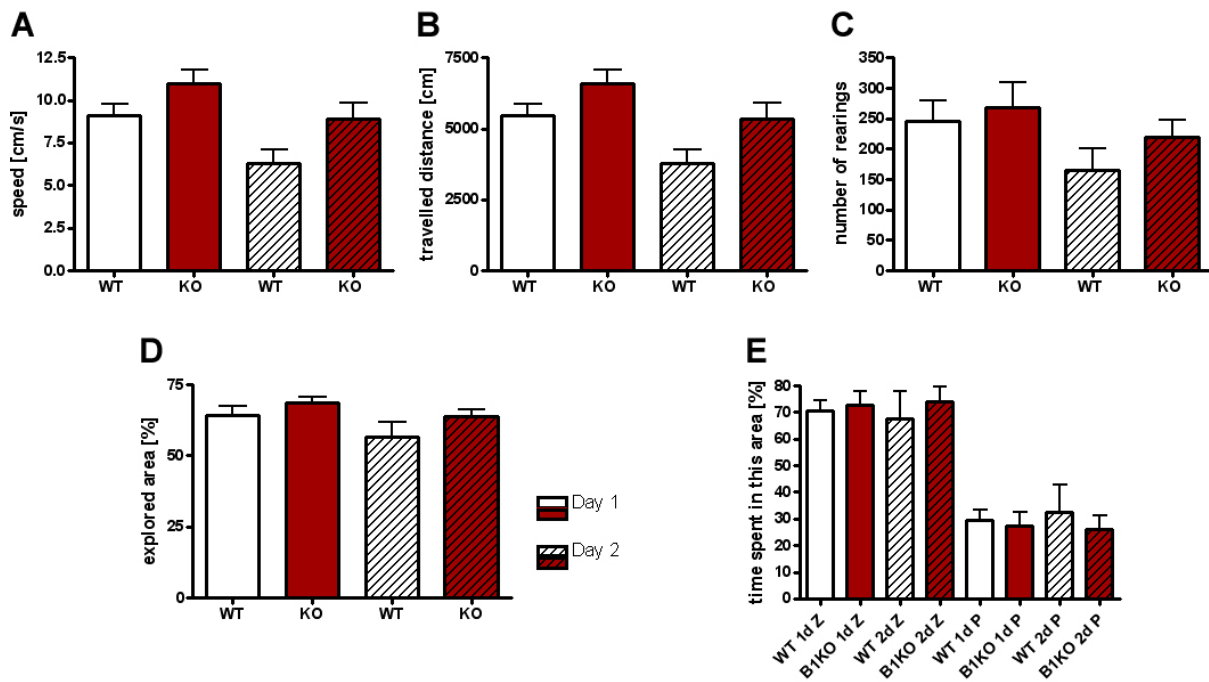
Die Mäuse wurden für jeweils 10min in eine abgedunkelte Box gesetzt und alle Aktionen der Tiere registriert und aufgezeichnet. Der Test wurde während der aktiven Phase der Tiere durchgeführt und am Folgetag wiederholt.

Bezüglich der Aktivitäts-Parameter zurückgelegte Wegstrecke, Geschwindigkeit und Anzahl der Aufrichtungen verhielten sich CNGB1-defiziente Mäuse genauso wie die Kontrolltiere (Abb. 3-4A-C). WT-Tiere legten im Schnitt 5,5m ( $5,5 \pm 0,4\text{m}$ ,  $n=8$ ), KO-Mäuse 6,6m ( $6,6 \pm 0,5\text{m}$ ,  $n=9$ ,  $p=0,09$ ) Wegstrecke zurück, die durchschnittliche Geschwindigkeit betrug dabei für beide Gruppen um die 10cm/s (WT:  $9,1 \pm 0,7\text{cm/s}$ ,  $n=8$ , KO:  $11,0 \pm 0,8\text{cm/s}$ ,  $n=9$ ,  $p=0,09$ ). WT-Tiere richteten sich im Schnitt knapp 250mal auf ( $245,8 \pm 33,1$ ,  $n=8$ ), bei den KO-Mäusen war die Häufigkeit vergleichbar ( $268,6 \pm 40,8$ ,  $n=9$ ,  $p=0,068$ ).

Auch hinsichtlich der erforschten Fläche (bezogen auf die Gesamtfläche) und der Aufenthaltswahrscheinlichkeit (relative Aufenthaltszeit in peripheren oder zentralen Gebieten der Box) waren beide Gruppen nicht zu unterscheiden (Abb. 3-4D und E). Beide Gruppen nutzten gut 60% der angebotenen Fläche (erforschte Fläche WT:  $60,6 \pm 1,3\%$ , KO:  $66,2 \pm 7,0\%$ ,  $p=0,1$ ) und hielten sich in vergleichbarem Maße in zentralen und peripheren Arealen der Box auf (Aufenthalt in peripheren Gebieten WT:  $30,9 \pm 15,7\%$ ,  $p=0,5$ , KO:  $26,6 \pm 15,7\%$ ; Aufenthalt in zentralen Gebieten WT:  $69,1 \pm 21,3\%$ , KO:  $73,4 \pm 15,7\%$ ,  $p=0,5$ , Abb. 3-4.2).

Eine verminderte Grundaktivität liegt bei CNGB1KO-Mäusen also offenbar nicht vor. Ebenso wenig unterscheiden sich bevorzugter Aufenthaltsort und ausgenutzte Fläche voneinander.





**Abb. 3-4** CNGB1KO-Mäuse zeigen keine verminderte Aktivität im Open Field Test. **A** Zurückgelegte Wegstrecke, **B** Durchschnittsgeschwindigkeit und **C** Anzahl der Aufrichtungen waren bei beiden Gruppen vergleichbar. **D** Erforschte Fläche und **E** bevorzugter Aufenthaltsort unterschieden sich ebenfalls nicht (1d Z bzw. 2d Z: Tag 1 bzw. Tag 2, zentrale Areale; 1d P bzw. 2d P: Tag 1 bzw. 2 periphere Bereiche der Box).

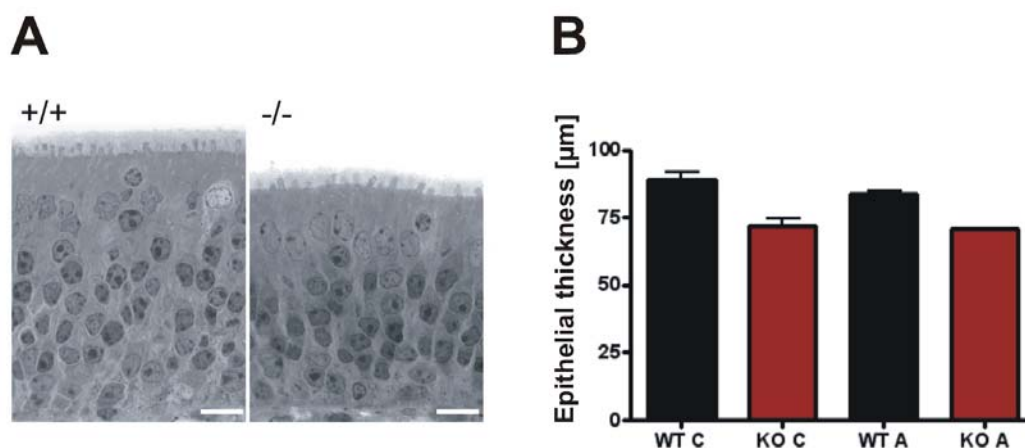
Um zu überprüfen, ob das eingeschränkte Riechvermögen der CNGB1KO-Mäuse durch mangelhafte Ausreifung oder sonstige Veränderungen des olfaktorischen Epithels verursacht wurde, wurden Riechepithelien von Knockout- und Wildtyp-Mäusen histologisch und immunhistochemisch untersucht.

### 3.5 Die Schichtdicke des olfaktorischen Epithels von CNGB1KO-Tieren ist vermindert

Zunächst wurde die Morphologie olfaktorischer Epithelien von WT- und CNGB1KO-Tieren anhand von gefärbten Semidünnschnitten untersucht. Wie in Abb. 3-5A ersichtlich, ist der grundsätzliche Aufbau des Epithels bei beiden Gruppen gleich.

Zur Ermittlung der Schichtdicke des olfaktorischen Epithels wurde an zwei verschiedenen Stellen des OE (Zone A und Zone C, vgl. Methodenteil) eine Serie von Kryoschnitten im Querschnitt angefertigt und diese nach einer Nissl-Färbung jeweils links und rechts der Nasenscheidewand vermessen.

Im Vergleich zu WT-Tieren war bei den KO-Mäusen eine Reduktion der mittleren Epitheldicke um 15-20% zu sehen (Zone A WT:  $83,7 \pm 1,3\mu\text{m}$ ,  $n=3$ , KO:  $70,7 \pm 0,3\mu\text{m}$ ,  $n=3$ ,  $p<0,0001$ ; Zone C WT:  $89,9 \pm 2,5\mu\text{m}$ ,  $n=3$ , KO:  $72,1 \pm 2,6\mu\text{m}$ ,  $n=3$ ,  $p>0,001$ ; Abb. 3-5B).



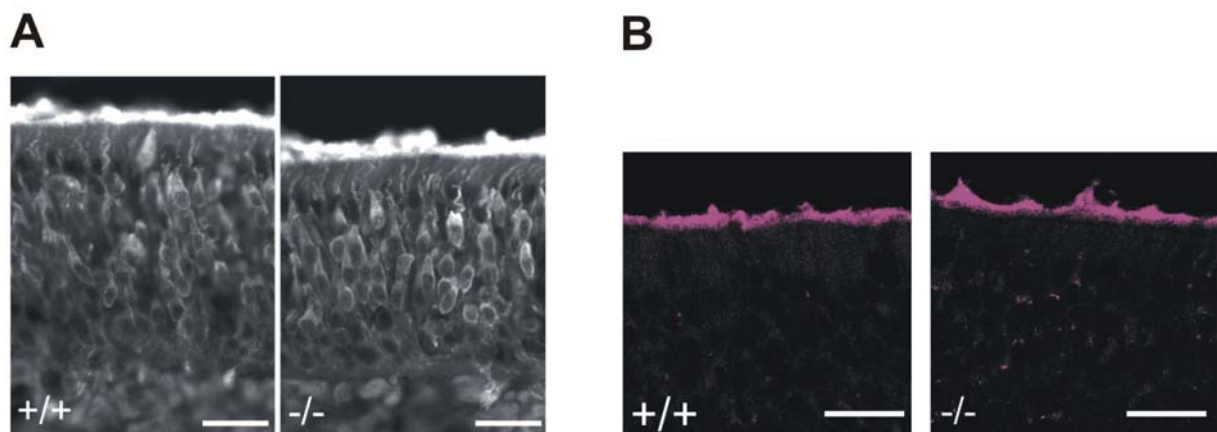
**Abb. 3-5** Morphologie und Schichtdicke des olfaktorischen Epithels (+/+ WT, -/- CNGB1KO). **A** Mit Toluidinblau angefärbte repräsentative Semidünnschnitte von WT- (links) und CNGB1KO- (rechts) Tieren (litter-matched, 10 Wochen alt, Balken: 10μm). Der grundsätzliche Aufbau des Epithels ist bei KO-Tieren nicht verändert. **B** Das olfaktorische Epithel von KO-Tieren ist um 15-20% dünner als das von WT-Tieren (Tiere 4 Wochen alt).

Nachfolgend wurden Kryoschnitte von Knockout- und Wildtyp-Tieren immunhistochemischen Untersuchungen unterzogen, um Aufschluss über den Reifezustand der olfaktorischen Rezeptorneuronen und den Zustand der olfaktorischen Zilien zu erhalten.

### 3.6 Normale Expression von OMP und ACIII in CNGB1KO-Mäusen

Das sogenannte olfaktorische Marker Protein (OMP) wird ausschließlich in reifen olfaktorischen Rezeptorneuronen exprimiert<sup>61</sup>. Der Nachweis von OMP eignet sich daher zur Überprüfung des Reif Zustands der ORNs in CNGB1KO-Neuronen.

Durch immunhistochemische Färbung konnte OMP tatsächlich auch in den CNGB1-defizienten Riechneuronen nachgewiesen werden (Abb. 3-6A). Die Reifung der Neurone scheint also durch die Deletion der CNGB1-Untereinheit nicht negativ beeinflusst zu sein. Da auch die Adenylatzyklase III, welche an der Signaltransduktion in olfaktorischen Rezeptorneuronen beteiligt ist, in den Zilien der Neuronen nachgewiesen werden konnte (Abb. 3-6B), kann man davon ausgehen, dass die Zilien prinzipiell intakt sind. Auch in Western Blot Analysen konnte gezeigt werden, dass ACIII in beiden Tiergruppen gleich stark exprimiert wird (Daten nicht gezeigt.)

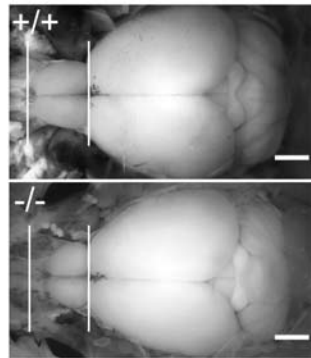


**Abb. 3-6** Immunhistochemischer Nachweis von OMP und ACIII im olfaktorischen Epithel von Wildtyp (+/+)- und CNGB1KO (-/-)-Mäusen. **A** Die Expression von OMP ist in CNGB1KO-ORNs genauso stark wie in ORNs aus WT-Tieren (Balken: 20µm). **B** Olfaktorische Zilien von CNGB1KO-Tieren exprimieren die ACIII in gleichem Ausmaß wie WT-Zilien (Balken: 20µm).

Die prinzipielle Funktionalität des olfaktorischen Epithels von CNGB1KO-Tieren konnte durch die beschriebenen Experimente gezeigt werden. Wie aber verhält es sich mit der Funktionalität der nachgeschalteten Stelle, dem Bulbus olfactorius, und findet überhaupt eine korrekte Verschaltung des Signals von den ORNs auf die periglomerulären Zellen des Bulbus statt?

### 3.7 Der Bulbus olfactorius von CNGB1KO-Tieren ist verkleinert, aber funktionsfähig

Bei der Präparation von Gehirnen war aufgefallen, dass der Bulbus olfactorius bei CNGB1KO-Tieren wesentlich kleiner war als bei WT-Tieren. Das übrige Gehirn dagegen war bezüglich der Größe nicht verändert (Abb. 3-7.1).

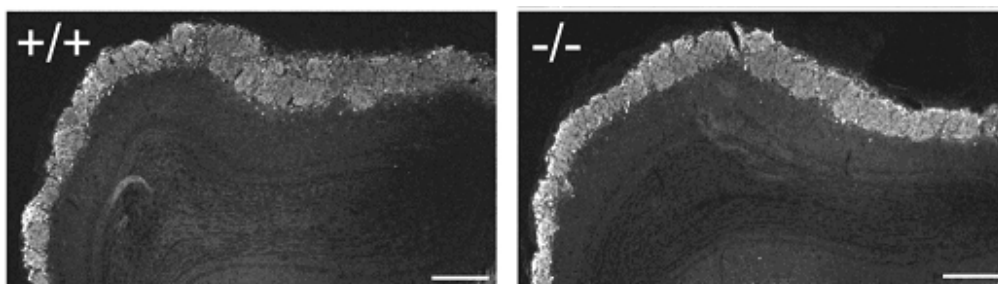


**Abb. 3-7.1** Gehirne einer WT- (+/+) und einer CNGB1KO-Maus (-/-). Während der Bulbus olfactorius bei CNGB1KO-Mäusen stark verkleinert war, zeigten sich die übrigen Regionen des Gehirns genauso groß entwickelt wie bei WT-Tieren. (Mäuse 4 Wochen alt, Balken: 2mm)

Ob die verringerte Größe des Bulbus mit einer eingeschränkten Funktionalität korrelierte, wurde in den nachfolgenden Experimenten überprüft.

Das Enzym Tyrosinhydroxylase (TH) wird in periglomerulären Zellen des Bulbus olfactorius exprimiert, solange die Zellen afferenten Input erhalten. Nach einer Läsion des olfaktorischen Epithels (beispielsweise mit TritonX-100 oder Zinksulfat) oder durch Zunähen eines Nasenlochs gehen Afferenzen zu Neuronen des Bulbus olfactorius verloren und die Expression von Tyrosinhydroxylase wird reduziert oder ganz eingestellt<sup>110</sup>. Tyrosinhydroxylase kann also als Marker-Protein für neuronal aktive Zellen verwendet werden.

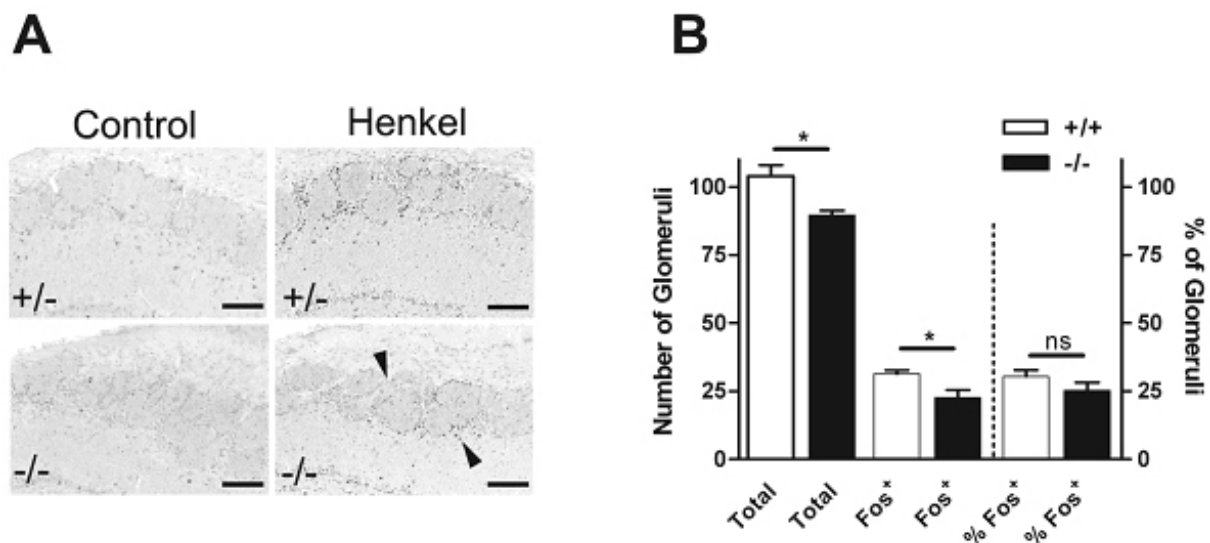
Mittels immunhistochemischer Untersuchungen (Abb. 3-7.2) sowie Western Blot Analyse (Daten nicht gezeigt) konnte nachgewiesen werden, dass die Expression von Tyrosinhydroxylase in den periglomerulären Zellen des Bulbus olfactorius von WT- und CNGB1KO-Tieren vergleichbar war. Die Verschaltung des Signals von olfaktorischen Neuronen auf Neuronen des Bulbus olfactorius ist also bei KO-Tieren trotz dessen verringerter Größe offenbar nicht gestört.



**Abb. 3-7.2** Immunhistochemischer Nachweis von Tyrosinhydroxylase in WT- (+/+) und CNGB1KO-Mäusen (-/-). Die Expression von TH erfolgt bei beiden Genotypen in vergleichbarem Ausmaß (Balken 200µm).

Eine weitere Möglichkeit, die Funktionalität des Bulbus olfactorius zu überprüfen, ist der Nachweis des Proteins Fos nach Stimulierung der ORNs mit einem Duftgemisch. Fos ist ein sogenanntes immediate early gene, das bei Stimulierung von Neuronen innerhalb kurzer Zeit exprimiert wird. Werden also periglomeruläre Neuronen des Bulbus olfactorius stimuliert, indem duftinduzierte Signale von ORNs eintreffen und verarbeitet werden, sollte die Menge des gebildeten Proteins Fos merklich ansteigen<sup>111</sup>.

Wie erwartet waren bei WT- und heterozygoten CNGB1-Mäusen nach Beduftung mit einem komplexen Duftgemisch (Henkel 100) wesentlich mehr Fos-positive periglomeruläre Neurone des Bulbus olfactorius nachzuweisen als bei Kontrolltieren, die anstatt des mit Henkel 100 gesättigten Duftstromes nur reine Laborluft erhielten. In CNGB1KO-Tieren konnte ebenfalls die Fos-Expression nachgewiesen werden, jedoch war die Anzahl der stimulierten Glomeruli (Fos<sup>+</sup>) wesentlich kleiner als bei WT-Tieren (WT:  $31,3 \pm 1,3$  n=3, CNGB1KO:  $22,7 \pm 2,7$ , n=3,  $p < 0,05$ ). Allerdings war hier auch die Gesamtzahl der Glomeruli kleiner als in WT-Mäusen (WT:  $104,0 \pm 4,0$ , n=3, CNGB1KO:  $89,7 \pm 1,6$ , n=3,  $p < 0,05$ ), weshalb der Anteil der stimulierten Glomeruli (%Fos) sich zwischen beiden Gruppen nicht signifikant unterschied (WT:  $30,3\% \pm 2,4\%$ , n=3, CNGB1KO:  $25,2\% \pm 2,9\%$ , n=3,  $p = 0,25$ , Abb. 3-7.3).

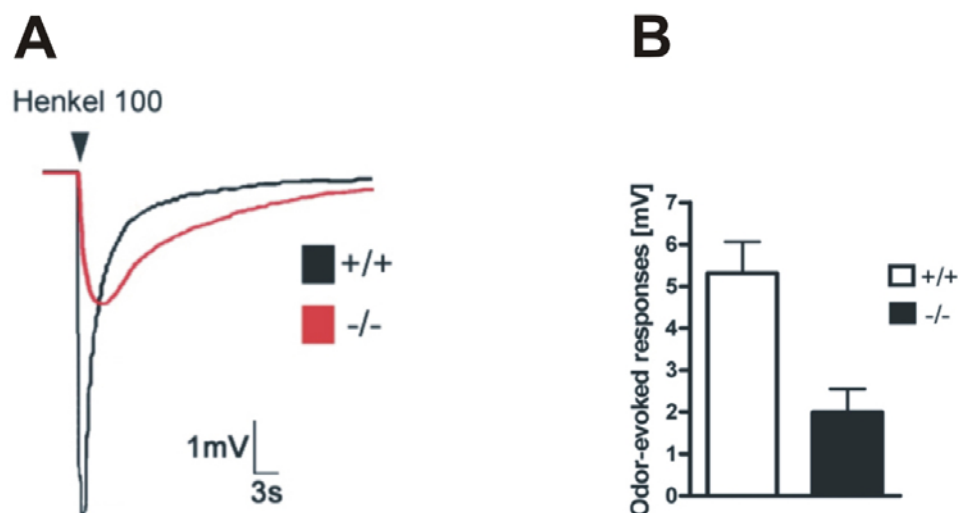


**Abb. 3-7.3** Expression von Fos im Bulbus olfactorius nach Stimulierung mit Henkel 100. **A** Duftinduzierte Fos-Expression in periglomerulären Neuronen von heterozygoten (+/-) und homozygoten CNGB1KO-Mäusen (-/-). Die Pfeile markieren Fos-positive Glomeruli in KO-Mäusen (Balken: 50µm). **B** Quantitative Auswertung der Gesamtzahl der Glomeruli und der Fos-positiven Glomeruli (Fos<sup>+</sup>) in WT- (weiße Balken) und KO-Mäusen (schwarze Balken). Der Anteil der stimulierten Glomeruli bezogen auf die Gesamtzahl ist bei beiden Gruppen gleich.

### 3.8 Veränderte Kinetik und Amplitude der Duftantwort von CNGB1KO-Mäusen im EOG

Anhand der Untersuchungen am Bulbus olfactorius konnte gezeigt werden, dass eine korrekte Verschaltung von ORNs auf periglomeruläre Zellen des OB erfolgte. Um nun die Funktionalität des olfaktorischen Epithels zu untersuchen, wurden in Kooperation mit Herrn Dr. Christian Wetzel, Ruhr-Universität Bochum, Elektroolfaktogramme (EOGs) aufgenommen. Das olfaktorische Epithel wurde freigelegt und mit Henkel 100-gesättigter Luft angeströmt. Die induzierten Potentiale wurden über Elektroden abgeleitet und aufgezeichnet.

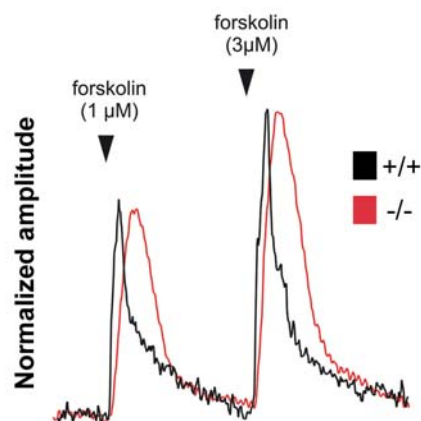
Übereinstimmend mit den Ergebnissen aus dem Riechtest konnten auch bei CNGB1KO-Tieren elektrische Potentiale gemessen werden. Allerdings unterschied sich die Duftantwort in drei Punkten deutlich vom WT. Am auffälligsten war die stark verringerte Amplitude im EOG von CNGB1-Mäusen, welche sich um Faktor 2,5 vom Wildtyp unterschied (WT:  $5,31 \pm 0,76\text{mV}$ ,  $n=10$ , CNGB1KO:  $1,99 \pm 0,59\text{ mV}$ ,  $n=15$ ,  $p<0,005$ , Abb. 3-8.1B). Daneben zeigte sich auch die Kinetik der Duftantwort im Vergleich zum Wildtyp verändert. Sowohl Einsetzen (onset) also auch Abklingen (recovery) der Duftantwort waren im EOG von CNGB1KO-Tieren verlangsamt (Abb. 3-8.1A und Tabelle1).



**Abb. 3-8.1** EOGs von WT- und CNGB1KO-Mäusen. **A** Repräsentative EOGs eines adulten WT- (+/+, schwarze Kurve) und eines CNGB1KO- (-/-, rote Kurve) Tieres nach einem 1s-Puls von Henkel 100. **B** Die Amplitude im Olfaktogramm ist bei CNGB1KO-Tieren um den Faktor 2,5 kleiner als bei WT-Tieren.

Calcium Imaging Experimente (in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Marc Spehr, Ruhr-Universität Bochum) an isolierten olfaktorischen Rezeptorneuronen lieferten den EOGs entsprechende Ergebnisse. Nachdem ORNs mit dem Calcium-sensitiven Farbstoff Fura-2 beladen worden waren, erfolgte eine Stimulation der Neuronen mit Forskolin, einem Aktivator der ACIII, oder mit Henkel 100 und anschließend die Messung der emittierten Fluoreszenz.

Sowohl in den dendritischen Knobs von WT- als auch von CNGB1KO-Mäusen kam es zu einem transienten Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration, sichtbar an einer Zunahme der Fluoreszenz. Wie schon im EOG beobachtet, erfolgten in den KO-Neuronen sowohl Einsetzen als auch Abklingen der Stimulus-induzierten Antwort jeweils zeitverzögert. (Abb. 3-8.2). Außerdem lag die Schwelle für die Induktion eines Calcium-Signals höher als in WT-Neuronen: während bei beiden Genotypen mehr als 90% aller ORNs auf 3µM Forskolin antworteten (WT: 33 von 35 ORNs, CNGB1KO: 32 von 35 ORNs), reagierten im Vergleich zum Wildtyp deutlich weniger KO-ORNs auf 1µM Forskolin (WT: 25 von 35 ORNs, CNGB1KO: 17 von 35 ORNs).



**Abb. 3-8.2** Forskolin-induzierte Fluoreszenz von Fura2-beladenen WT- (+/+, schwarze Kurve) und KO- (-/-, rote Kurve) ORNs. Wie beim EOG ist der Kurvenverlauf bei ORNs aus CNGB1KO-Tieren verändert.

Tabelle 1. Statistische Auswertung der Antwort auf Düfte und Forskolin.

EOG				
		CNGB1 <sup>+/+</sup> (n)	CNGB1 <sup>-/-</sup> (n)	t-test
Onset	Time to peak [s]	0,66 ± 0,11 (9)	2,82 ± 0,54 (10)	p < 0,005
Recovery	τ <sub>1</sub>	1,16 ± 0,32 (9)	5,72 ± 1,19 (9)	p < 0,005
	τ <sub>2</sub>	25,10 ± 4,78 (9)	39,59 ± 8,76 (9)	ns
Forskolin-induziertes Signal in dendritischen Knobs				
		CNGB1 <sup>+/+</sup> (n)	CNGB1 <sup>-/-</sup> (n)	t-test
Onset	Time to peak [s]	8,3 ± 0,5 (29)	13,2 ± 1,3 (34)	p < 0,005
Recovery	τ	11,7 ± 1,2 (21)	19,7 ± 2,3 (28)	p < 0,01

Mittelwerte ± SEM.

τ: Zeitkonstanten, n: Anzahl der Zellen

Time to peak: Zeit bis zum Erreichen des Maximums

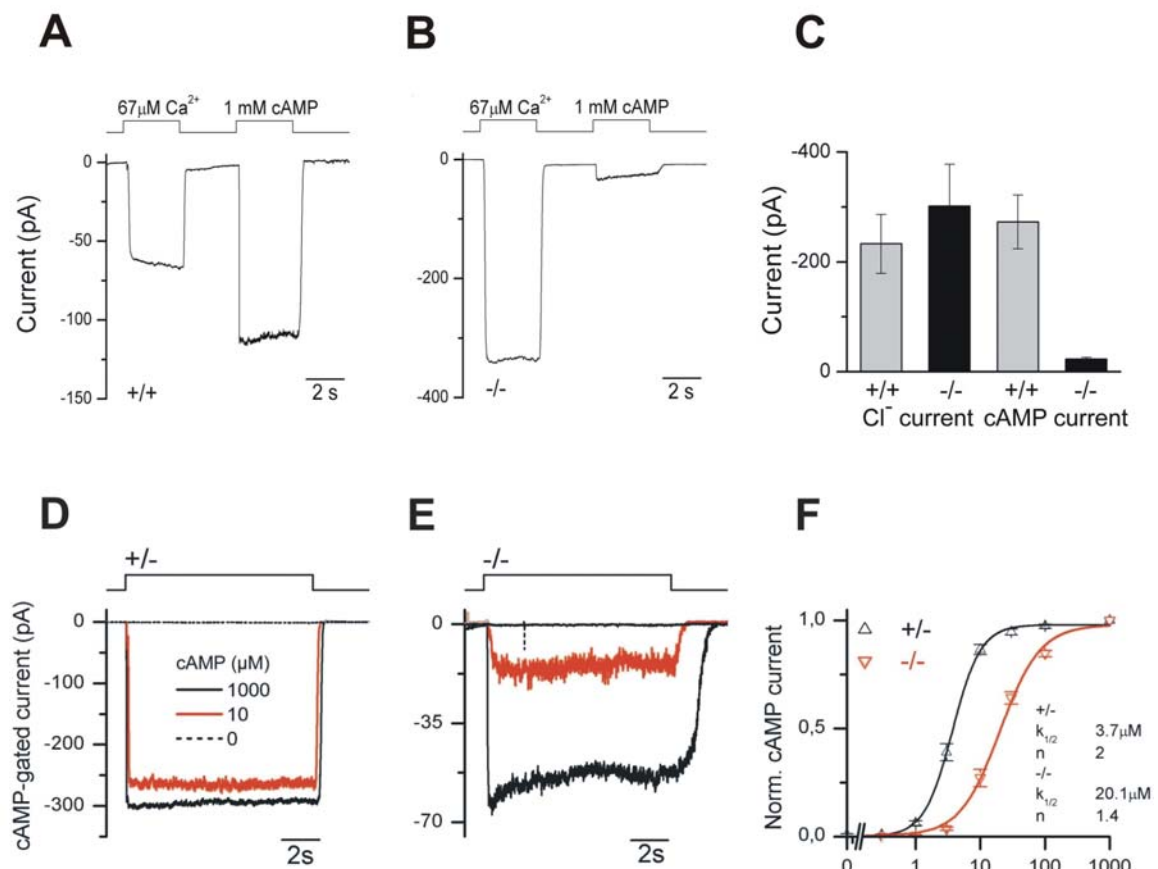
Onset: Einsetzen der Duftantwort

Recovery: Abklingen der Duftantwort

Anhand der vorhergehenden Experimente konnte deutlich gezeigt werden, dass die olfaktorischen Rezeptorneurone von CNGB1KO-Tieren tatsächlich in der Lage sind, auf Düfte zu reagieren und das Signal auch adäquat weiterzuleiten. Allerdings scheint die Detektion der Düfte mit geringerer Sensitivität und veränderter Kinetik zu erfolgen. Es stellte sich nun die Frage, ob diese Abweichungen mit veränderten Eigenschaften des CNG-Stroms in KO-Neuronen korrelierten.

### 3.9 Der CNG-Strom in CNGB1KO-Tieren ist stark verringert und weniger sensitiv gegenüber zyklischen Nukleotiden

Zunächst wurde die Größe des CNG- und des nachgeschalteten Calcium-aktivierten Chlorid-Stroms in excised Patches dendritischer Knobs aus isolierten ORNs gemessen. In Neuronen beider Genotypen konnten für beide Kanäle Ströme gemessen werden. Während der Chlorid-Strom sich bei WT und KO nicht signifikant unterschied, war der CNG-Strom bei den KO-Tieren um Faktor 10 kleiner als bei WT-Mäusen (WT:  $273 \pm 49$  pA,  $n=9$ , KO:  $23 \pm 3$  pA,  $n=9$ ,  $p<0,005$ , Abb. 3-9.1A-E). Zudem zeigte sich für den CNG-Kanal der KO-Mäuse eine verringerte Sensitivität gegenüber zyklischen Nukleotiden. Die Affinität zu cAMP war um den Faktor 5 nach höheren cAMP-Konzentrationen verschoben, die Affinität zu cGMP um den Faktor 3 (Abb. 3-9.1F).



**Abb. 3-9.1** Elektrophysiologische Untersuchung von ORNs. Excised Patches dendritischer Knobs von **A** WT- und **B** CNGB1KO-ORNs wurden in Gegenwart von  $67 \mu\text{M Ca}^{2+}$  oder  $1 \text{ mM cAMP}$  vermessen. **C** Quantitative Auswertung von Chlorid- und CNG-Kanal-Strom. **D, E** Repräsentative Stromspuren von cAMP-vermitteltem Strom in WT- und CNGB1KO-ORNs (schwarze Kurven:  $1000 \mu\text{M}$  cAMP, rote Kurven:  $10 \mu\text{M}$  cAMP). **F** Dosis-Wirkungskurve. Die Sensitivität des CNG-Kanals gegenüber zyklischen Nukleotiden ist im KO-CNG-Kanal stark verringert.



Insgesamt verhielten sich die cAMP- und cGMP-Affinitäten von CNGB1WT- und CNGB1KO-Kanälen wie die für heterolog exprimierte CNGA2+A4+B1b- und CNGA2+A4-Kanäle (Tabelle 2).

Interessanterweise zeigten Stromspuren von KO-Neuronen bei cAMP-Konzentrationen, die den Kanal vollständig aktivieren, eine anfängliche Abnahme des Stroms, welche in Kontrollen zu keinem Zeitpunkt beobachtet werden konnte (Abb. 3-9.1D und E). Ein entsprechender Verlauf der Stromspur wurde bereits für heterolog exprimierte CNGA2/CNGA4-Kanäle der Ratte beschrieben<sup>14</sup>.

**Tabelle 2 Sensitivität nativer und heterolog exprimierter olfaktorischer CNG-Kanäle gegenüber zyklischen Nukleotiden**

Kanaltyp	cAMP			cGMP		
	n	K <sub>1/2</sub> (μM)	k	n	K <sub>1/2</sub> (μM)	k
Native ORNs						
CNGB1 <sup>+/-</sup>	6	3.70 ± 0.11	1.99 ± 0.11	5	2.64 ± 0.08	1.88 ± 0.11
CNGB1 <sup>-/-</sup>	6	20.15 ± 1.74	1.40 ± 0.14	8	6.90 ± 0.38	1.40 ± 0.09
Expression in HEK293-Zellen						
CNGA2+A4+B1b	7	6.6 ± 0.96	1.55 ± 0.16	10	2.80 ± 0.14	2.40 ± 0.27
CNGA2+A4	11	17.5 ± 1.22	1.64 ± 0.05	12	3.06 ± 0.16	1.58 ± 0.12

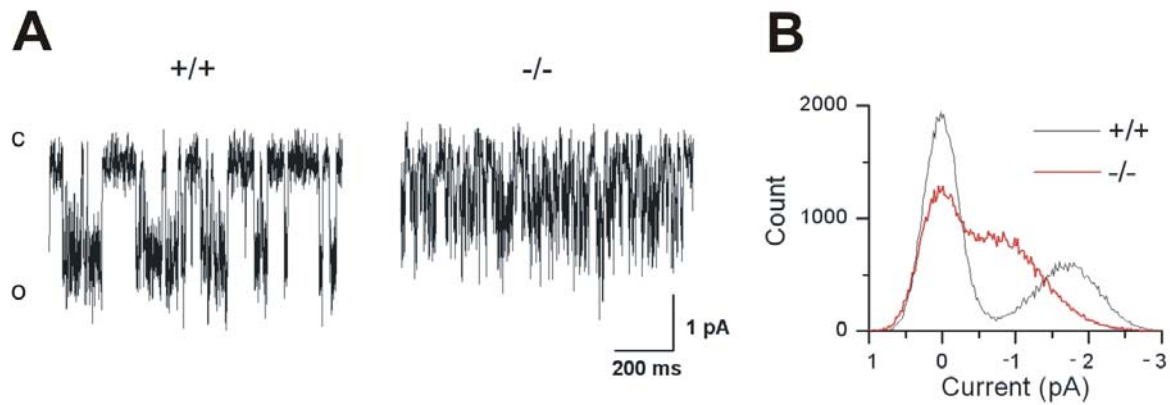
Mittelwerte ± SEM.

Das Membranpotential betrug -40 mV bei nativen Zellen und -60 mV bei heterologer Expression der Kanäle.

k: Hill-Koeffizient; n: Anzahl der Zellen.

Anhand von Einzelkanalmessungen konnte bei WT-ORNs ein sehr schneller Wechsel zwischen Öffnen und Schließen des Kanals, das sogenannte Single Channel Flickering, beobachtet werden. CNG-Kanäle von KO-Tieren zeigten ein extrem beschleunigtes Single Channel Flickering (Abb. 3-9.2), was die Bestimmung der Einzelkanal-Leitfähigkeit unmöglich machte (Leitfähigkeit des WT-Kanals: 23 ± 1 pS bei -60 mV, n=8). Auch dieser Sachverhalt ist in Übereinstimmung mit *in vitro*-Daten des exprimierten CNGA2/CNGA4-Kanals der Ratte<sup>29</sup>.

Alle elektrophysiologischen Experimente an isolierten olfaktorischen Rezeptorneuronen wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Johannes Reiser und Dr. Jonathan Bradley, Johns-Hopkins University Baltimore, durchgeführt.



**Abb. 3-9.2** Einzelkanalmessungen an isolierten WT(+/-)- und CNGB1KO(-/-)- ORNs. **A** Single Channel Flickering eines WT- und eines CNGB1KO-Kanals (3 $\mu$ M cAMP bei WT und 10 $\mu$ M cAMP bei CNGB1KO). Offene (o) und geschlossene (c) Zustände des Kanals sind in der Abb. angedeutet. **B** Histogramm aller gemessenen Amplituden nach einer 18s andauernden cAMP-Exposition der Kanäle (graue Kurve: WT, rote Kurve: CNGB1KO).

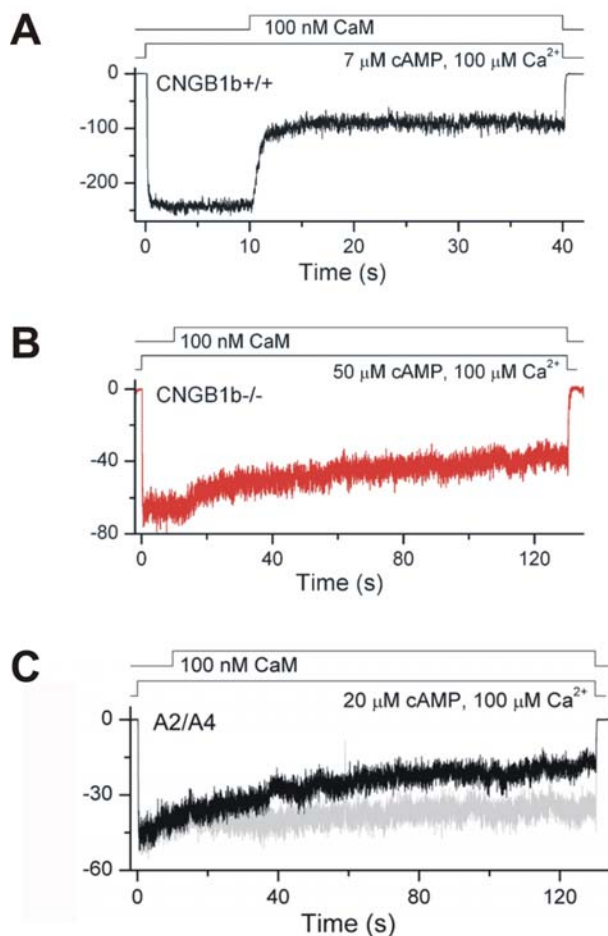
Der CNG-Strom ist in CNGB1-defizienten olfaktorischen Rezeptorneuronen also zum einen kleiner, zum anderen zeigt er auch andere Eigenschaften als der Wildtyp-Strom. Wie verhält es sich nun mit der Ca-CaM-vermittelten Inhibierung des CNG-Stroms?

Wie in der Einleitung beschrieben (siehe Punkt 1.3), ist die schnelle Adaptation über Ca-CaM ein sehr wichtiger Mechanismus zur Beendigung der Signaltransduktion. Möglich wäre nun, dass dieser negative Feedback bei den CNGB1KO-Mäusen defekt ist und somit eine verlangsamte Abschaltung der Riechkaskade stattfindet.

Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurden isolierte olfaktorische Rezeptorneuronen in Gegenwart von Calcium und Calmodulin elektrophysiologisch untersucht.

### 3.10 Fehlende Ca-CaM-abhängige Inhibierung des CNG-Stroms in CNGB1KO-ORNs

Excised Patches von WT-Neuronen wurden mit 100nM Calmodulin und 100 $\mu$ M Ca<sup>2+</sup> inkubiert, worauf es zu einer schnellen Inaktivierung des cAMP-vermittelten Stromflusses kam ( $\tau_{\text{fast}}=1,1 \pm 0,1$ s,  $\tau_{\text{slow}}=60 \pm 33$ s, n=9, Abb. 3.10A). Dagegen war die Inhibierung bei KO-Neuronen bei gleicher Calmodulin- und Ca<sup>2+</sup>-Konzentration um den Faktor 100 verlangsamt ( $\tau=107 \pm 29$ s, n=3, Abb. 3-10B). Eine ähnlich langsame Kinetik konnte für heterolog exprimierte CNGA2/CNGA4-Kanäle gemessen werden ( $\tau=63 \pm 11$ , n=11, Abb. 3-10C).



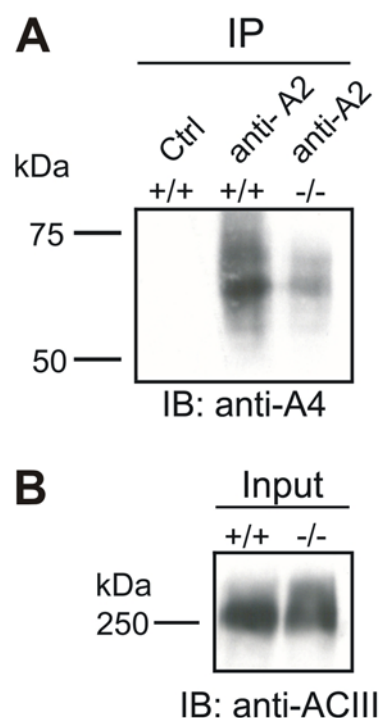
**Abb. 3-10** Ca-CaM-abhängige Inhibition des CNG-Stroms. Excised Patches von **A** WT- und **B** CNGB1KO-ORNs bzw. **C** HEK293-Zellen, transfiziert mit CNGA2 und CNGA4, wurden einer cAMP-Konzentration ausgesetzt, die eine 75%ige Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle gewährleistete. Die Zugabe von Calmodulin führte in WT-ORNs zu einem raschen Abfall des CNG-Stroms, bei KO-Neuronen und den transfizierten HEK293-Zellen war dies nicht zu beobachten. Die graue Kurve in (C) zeigt den cAMP-induzierten Strom in Abwesenheit von Ca-CaM.

Die biophysikalischen Eigenschaften des olfaktorischen CNG-Kanals von KO-Tieren sind konsistent mit heterolog exprimierten CNGA2/CNGA4-Kanälen. Allerdings bleibt die Frage bestehen, warum der cAMP-vermittelte Strom so stark verringert ist. Um diesen Sachverhalt aufzuklären, wurden Untersuchungen auf Proteinebene durchgeführt.

### 3.11 CNGB1 und CNGA2 interagieren in CNGB1KO-ORNs

Mittels Co-Immunpräzipitation wurde zunächst überprüft, ob die Untereinheiten CNGA2 und A4 in ORNs von CNGB1KO-Tieren interagieren. Mit olfaktorischen Zilien angereicherte Membranpräparationen von WT- und CNGB1KO-Tieren wurden mit einem Antikörper gegen CNGA2 präzipitiert und anschließend auf einem Gel aufgetrennt. Es folgte die immunologische Detektion von CNGA4. Um einen quantitativen Vergleich zu ermöglichen, wurde jeweils ein Teil der Membranproteine ohne vorhergehende Präzipitation mit einem Antikörper elektrophoretisch aufgetrennt und die Adenylatzyklase III (ACIII), die in beiden Gruppen gleich stark in den ORNs exprimiert wird, als Ladekontrolle nachgewiesen.

Tatsächlich konnte CNGA4 auch in den Immunpräzipitaten von KO-Tieren nachgewiesen werden, auch hier findet also eine Interaktion der beiden Untereinheiten statt. Allerdings war das CNGA4-Signal bei Präparationen aus KO-Mäusen wesentlich schwächer als bei WT-Präparationen (Abb. 3-11).



**Abb. 3-11** Co-Immunpräzipitation. **A** CNGA2 und CNGA4 interagieren in ORNs sowohl von WT- als auch von CNGB1KO-Mäusen. Gleiche Mengen (210µg) Membranprotein aus beiden Gruppen wurden mit anti-CNGA2 (bzw. einem Kontrollantikörper als Negativkontrolle) präzipitiert, elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mit anti-CNGA4 hybridisiert. **B** 15% der Membranproteine aus (A) wurden elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mit einem Antikörper gegen ACIII hybridisiert.

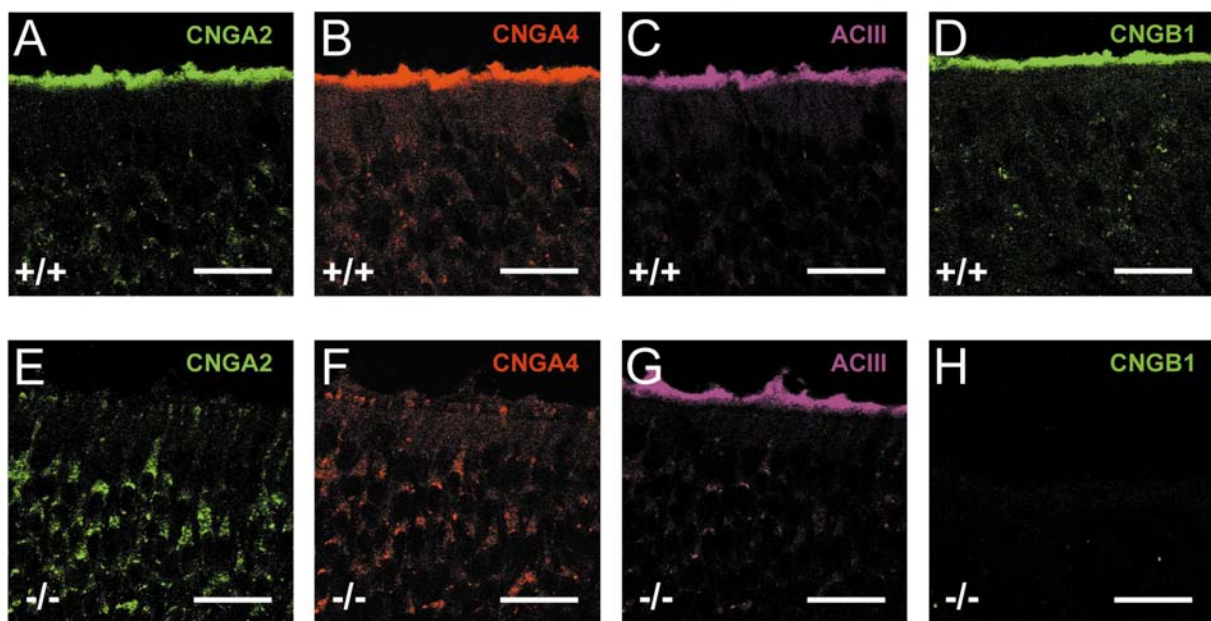
Die genaue Lokalisierung von CNGB1, CNGA2 und CNGA4 im olfaktorischen Epithel von CNGB1KO-Mäusen wurde durch immunhistochemische Untersuchungen aufgeklärt.

### 3.12 Der Verlust von CNGB1b führt zu einer Retention des Kanals in subziliären Kompartimenten

Kryoschnitte von Mäusen beider Gruppen wurden mit Antikörpern gegen CNGB1, CNGA2 und CNGA4 inkubiert und nach Fluoreszenzmarkierung an einem Konfokalmikroskop detektiert.

Bei WT-Mäusen waren alle drei Kanal-Subtypen wie erwartet vor allem in den olfaktorischen Zilien der ORNs, dem Ort der Signaltransduktion, angereichert. Im Soma war nur ein sehr schwaches Signal zu erkennen (Abb. 3-12.1A-D). Ein ganz anderes Bild ergab sich dagegen bei CNGB1KO-Tieren: CNGA2 und CNGA4 konnten nicht in den Zilien nachgewiesen werden, in den Somata, Dendriten und Knobs der ORNs jedoch schienen sich die Untereinheiten angehäuft zu haben (Abb. 3-12.1E-G).

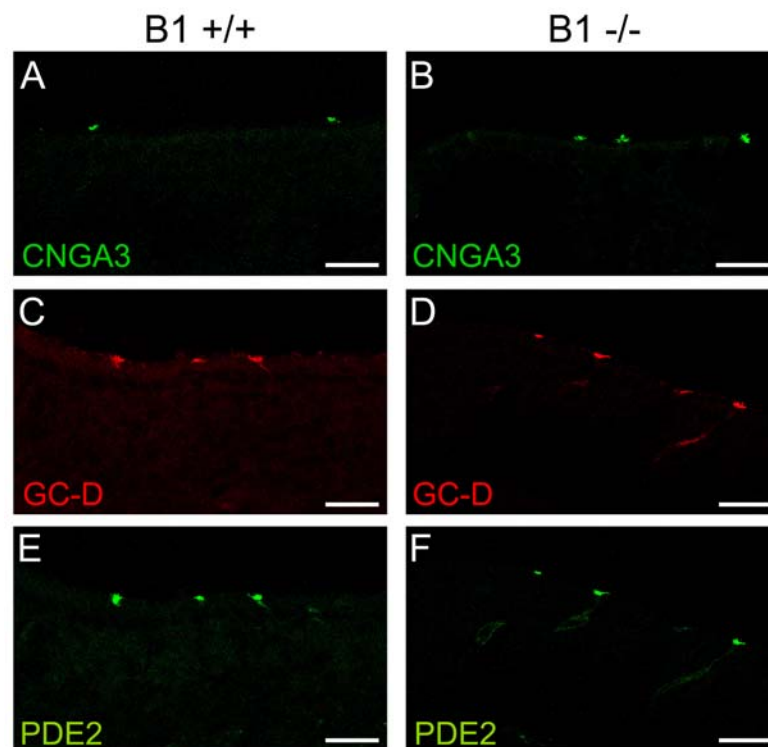
Die ACIII konnte bei beiden Genotypen in vergleichbarer Intensität in den Zilien der ORNs nachgewiesen werden, diese schienen also intakt zu sein (Abb. 3-12.1C und G). Bei KO-Tieren konnte CNGB1b erwartungsgemäß nicht nachgewiesen werden (Abb. 3-13.1H).



**Abb. 3-12.1** Immunhistochemischer Nachweis von **A, E** CNGA2, **B, F** CNGA4, **C, G** ACIII und **D, H** CNGB1 im olfaktorischen Epithel von Wildtyp- (+/+) und CNGB1KO- (-/-) Mäusen (Balken: 20µm). Die Expression von CNGA2 und CNGA4 beschränkt sich bei CNGB1-defizienten Tieren auf Somata, Dendriten und Knobs der ORNs. In den Zilien der Neuronen ist lediglich die ACIII nachweisbar, die in gleichem Maße wie beim Wildtyp exprimiert wird.

Wie in der Einleitung beschrieben, verläuft die Signaltransduktion in einer Subpopulation olfaktorischer Rezeptorneurone cGMP-vermittelt. Es wäre nun denkbar, dass bei Einschränkung des cAMP-Signalweges durch Deletion des CNGB1b-Kanals eine Hochregulation dieser alternativen Signalkaskade stattfindet.

Dass dies in CNGB1-defizienten ORNs jedoch nicht der Fall ist, konnte ebenfalls durch immunhistochemische Experimente gezeigt werden. Weder CNGA3, noch die Gyanlylatzyklase D (GC-D), noch die Phosphodiesterase 2 (PDE2) wurden in olfaktorischem Epithel von CNGB1KO-Mäusen in verstärktem Maße exprimiert. Die Anzahl der CNGA3-positiven Neuronen war bei beiden Gruppen vergleichbar (Abb. 3-12.2).



**Abb. 3-12.2** Konfokale Aufnahmen immunhistochemisch gefärbter Kryoschnitte. Die Expression von **A, B** CNGA3, **C, D** GC-D und **E, F** PDE2 im olfaktorischen Epithel von WT- (links) und CNGB1KO- (rechts) Tieren wird nicht hochreguliert (Balken: 20µm).

Der olfaktorische CNG-Kanal in CNGB1KO-Neuronen scheint also ein heteromerer Kanal aus CNGA2- und CNA4-Untereinheiten zu sein, der fälschlicher Weise nicht in den Zilien, sondern in Somata, Dendriten und Knobs der ORNs lokalisiert ist. Offenbar benötigt der Kanal also CNGB1b, um in die Zilien der ORNs zu gelangen.

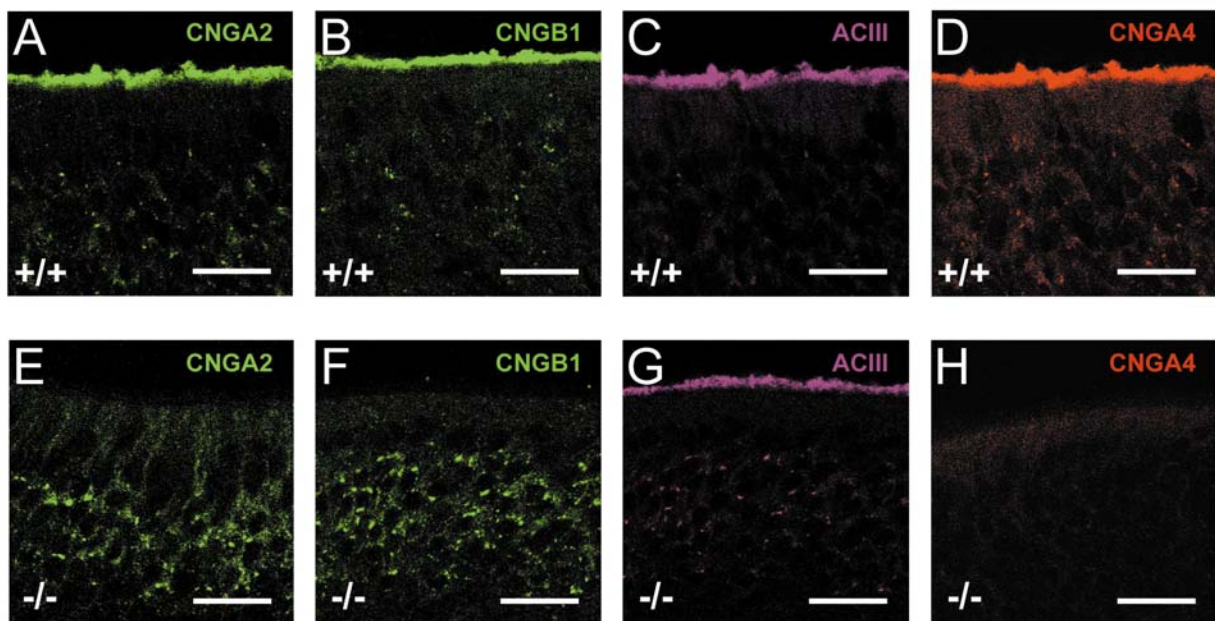
Genügt nun CNGB1b alleine, um das Targeting des CNG-Kanals in das Zilium zu gewährleisten? Oder spielt hier auch die zweite modulatorische Untereinheit, CNGA4, eine Rolle? Um diese Frage zu klären, wurden CNGA4-defiziente Mäuse<sup>63</sup> untersucht.



### 3.13 CNGB1b und CNGA4 sind für den Transport des CNG-Kanals ins Zilium essentiell

Präparate olfaktorischen Epithels von CNGA4-defizienten Mäusen<sup>63</sup> wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Jonathan Bradley, Johns-Hopkins-University Baltimore, zur Verfügung gestellt. Auch hier erfolgte der immunhistochemische Nachweis der einzelnen CNG-Kanaluntereinheiten an Kryoschnitten des Epithels.

Überraschenderweise war der in den CNGA4KO-Mäusen verbleibende CNG-Kanal aus CNGA2 und CNGB1b nicht in der Lage, in die Zilien der Riechneuronen zu gelangen. Wie bei CNGB1KO-Mäusen akkumulierten die Kanaluntereinheiten statt dessen in Somata, Dendriten und Knobs der Zellen (Abb. 3-13E, F). Auch hier fand eine normale Expression der ACIII statt (Abb. 3-13G), weshalb davon auszugehen war, dass die Zilien prinzipiell intakt und funktionell waren.



**Abb. 3-13** Immunhistochemischer Nachweis der Expression von **A, E** CNGA2, **B, F** CNGB1, **C, G** ACIII und **D, H** CNGA4 in WT- (+/+) und CNGA4KO- (-/-) Mäusen (Balken: 20µm). Wie bei CNGB1-defizienten Tieren ist auch bei CNGA4KO-Mäusen das Signal der verbleibenden Kanaluntereinheiten nur in Somata, Dendriten und Knobs nachweisbar. Die Expression der ACIII dagegen unterscheidet sich nicht vom Wildtyp.

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass die Abwesenheit sowohl von CNGB1b als auch von CNGA4 zu einer Retention der CNG-Untereinheiten in subziliären Kompartimenten der Zelle führt.

Obwohl die mRNA-Level sowohl von CNGA2 als auch von CNGA4 in olfaktorischem Epithel von CNGB1KO-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp unverändert waren (Daten nicht gezeigt), war eine verminderte Expression der Kanalproteine CNGA2 und CNGA4 (vgl. Abb. 3.11 und Abb. 3-12.1E, F) festzustellen. Eine mögliche Erklärung für diesen Sachverhalt wäre, dass der mutierte CNG-Kanal als fehlerhaft lokalisiert erkannt und durch das Proteasom abgebaut wurde. Es stellte sich die Frage, ob es möglich ist, den CNGB1b-defizienten Kanal im Zilium zu detektieren, wenn man dessen proteasomalen Abbau hemmt.

Um dieser Frage nachzugehen, wurden CNGB1-defiziente Mäuse mit einem Hemmstoff des Proteasoms behandelt und das olfaktorische Epithel nach einer gewissen Inkubationszeit immunhistochemisch untersucht.

### **3.14 Akkumulation von CNGA2 und CNGA4 im olfaktorischen Epithel von CNGB1KO-Mäusen führt nicht zu einer Translokation des CNG-Kanals in die Zilien**

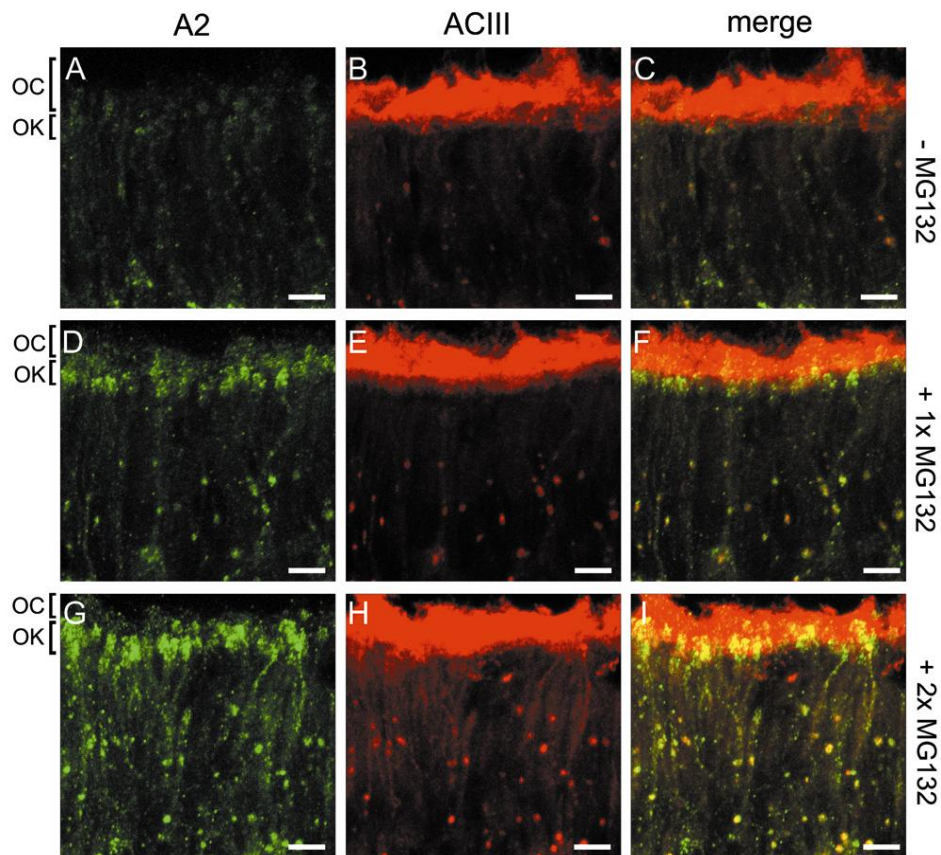
CNGB1-defiziente Mäuse erhielten entweder eine oder zwei Injektionen des Proteasominhibitors MG132<sup>102</sup> (jeweils 10µg/g Körpergewicht; Zeitspanne zwischen erster und zweiter Injektion: 24h). Kontrolltiere erhielten eine Injektion aus reiner Pufferlösung. Nach einer Inkubationszeit von 20 Stunden wurden die olfaktorischen Epithelien präpariert und ein immunhistochemischer Nachweis der CNG-Kanaluntereinheiten vorgenommen.

Bei den mit MG132 behandelten Tieren konnte zwar tatsächlich eine Akkumulation der untersuchten Proteine in Dendriten und Knobs der ORNs festgestellt werden, jedoch konnte kein Signal in den olfaktorischen Zilien detektiert werden (Abb. 3-1D; exemplarisch ist der Nachweis von CNGA2 gezeigt, für CNGA4 ergab sich das gleiche Bild).

Nach einer weiteren Dosis des Proteasominhibitors und entsprechender Inkubationszeit akkumulierte zwar noch mehr Protein, allerdings fand auch hier keine Translokation von CNGA2 und CNGA4 in das Zilium statt (Abb. 3-14G).

Um den Zustand der Zilien der olfaktorischen Rezeptorneurone der behandelten Tiere zu überprüfen, erfolgte ein Nachweis der ACIII. Die Expression der ACIII verhielt sich bei behandelten und Kontroll-Tieren gleich, ein genereller Defekt der Zilienfunktion konnte also auch hier als Ursache für das fehlende Targeting in das Zilienkompartiment ausgeschlossen werden (Abb. 3-14C, F, I).





**Abb. 3-14.** Expression von CNGA2 und ACIII in 4 Wochen alten CNGB1KO-Mäusen nach Injektion von **A-C** reiner Pufferlösung, **D-F** einer Einzeldosis MG132 oder **G-I** zwei Dosen MG132 (Balken: 10µm, OC: olfaktorische Zilien, OK: dendritischer Knob). CNGA2 akkumuliert zwar nach Applikation von MG132, kann aber nicht in den Zilien der ORNs nachgewiesen werden.

Der Abbau von CNGA2 und CNGA4 in ORNs von CNGB1KO-Tieren wird also durch Applikation des Proteasominhibitors MG132 tatsächlich gehemmt. Allerdings erfolgt trotz der massiven Anhäufung des Kanalproteins kein Transport in das Zilium, dem eigentlichen Ort der Signaltransduktion.

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Deletion von CNGB1b im olfaktorischen CNG-Kanal führt zu eingeschränkter Riechfunktion

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, die Frage zu beantworten, ob CNGB1-defiziente Riechneurone prinzipiell noch funktionsfähig sind oder ob die Deletion von CNGB1b zu einem generellen Verlust der Riechfunktion führt.

Es konnte gezeigt werden, dass CNGB1KO-Mäuse durchaus in der Lage sind, Gerüche zu detektieren. Allerdings ist das Riechvermögen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren deutlich eingeschränkt. So liegt die Reizschwelle zur Wahrnehmung von Düften bei höheren Duftkonzentrationen als beim Wildtyp. Zudem tritt die Duftantwort bei den CNGB1-defizienten Tieren zum einen zeitverzögert ein und fällt zum anderen auch kleiner aus. Schließlich fehlt den CNGB1KO-Mäusen die Fähigkeit zur schnellen Adaptation. Die Ursachen für diese veränderte Geruchswahrnehmung, und damit die Bedeutung von CNGB1b im Riechprozess, können durch die Ergebnisse dieser Arbeit erklärt werden.

Durch den Verlust von CNGB1b reagiert der olfaktorische CNG-Kanal weniger sensitiv auf die Anwesenheit zyklischer Nukleotide. Das heißt, es ist eine höhere Konzentration an cAMP und somit eine erhöhte Konzentration an Duftstoff oder eine längere Einwirkungsdauer des Dufts nötig, um den CNG-Kanal zu aktivieren. Als Folge lässt sich eine verzögert einsetzende Duftantwort im EOG beobachten.

Durch elektrophysiologische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der maximale CNG-Strom in CNGB1b-defizienten olfaktorischen Rezeptorneuronen um Faktor zehn verringert ist. An Einzelkanalmessungen von CNGB1KO-Neuronen wurde ein extrem beschleunigtes Single Channel Flickering beobachtet, was mit einer erniedrigten Offenwahrscheinlichkeit des Kanals gleichzusetzen ist. Dadurch ist der Einstrom von Calcium erschwert, was sicherlich seinen Beitrag zur Erniedrigung des CNG-Stroms beiträgt. Jedoch reicht dieser Befund alleine bei weitem nicht aus, um den ganzen Effekt zu verursachen. Die eigentliche Ursache für den verkleinerten CNG-Strom kann durch die Ergebnisse der Versuche auf Proteinebene erklärt werden.

Die Gesamtmenge an CNG-Kanalprotein ist bei CNGB1KO-Mäusen deutlich verringert. Somit ist auch die Anzahl der aktivierbaren Kanäle in der Membran kleiner, woraus ein verlangsamer Konzentrationsanstieg von Calcium im Zellinneren resultiert. Zudem findet in Abwesenheit von CNGB1b eine Retention von CNGA2 und CNGA4 in subziliären Zellkompartimenten statt. Die Proteine werden nicht in den eigentlichen Ort der Signaltransduktion, die olfaktorischen Zilien, transportiert, sondern verbleiben in Somata, Dendriten und Knobs der Zellen. Ein genereller Defekt der Zilienstruktur kann dabei als Ursache für den fehlenden ziliären Transport ausgeschlossen werden. Die verminderte Proteinmenge resultiert letztlich aus dem schnellen Abbau des fehllokalisierten CNGB1b-defizienten Kanals durch das Proteasom. Interessanterweise kann durch

Hemmung des Proteasoms durch einen spezifischen Inhibitor zwar CNGA2 und CNGA4 in den ORNs akkumulieren, jedoch erfolgt selbst mit diesem hohen Angebot an Protein keine Translokation in die Zilienmembran. Es existiert also offenbar eine Art Qualitätskontrolle in ORNs, die gewährleistet, dass nur der richtig assemblierte Kanal in die Membran der Zilien transportiert wird.

In heterologen Expressionssystemen konnte bereits eine Interaktion von CNGA4 und CNGB1b bei der Ca-CaM-abhängigen Inaktivierung nachgewiesen werden. Durch die Untersuchung der CNGB1b-Maus konnte nun die zentrale Rolle von CNGB1b bei der Geruchsadaptation auch *in vivo* deutlich gezeigt werden. Die Deletion von CNGB1b im olfaktorischen CNG-Kanal führt zu einer Ausschaltung der Ca-CaM-vermittelten Inaktivierung des CNG-Kanals. Die Mäuse sind nicht mehr fähig zur schnellen Duftadaptation. Dasselbe Phänomen lässt sich auch bei CNGA4KO-Mäusen beobachten. CNGA4-defiziente Mäuse sind aufgrund dieses Defekts nicht mehr in der Lage, in Anwesenheit eines Hintergrundduftes verschiedene Düfte voneinander zu unterscheiden (siehe Einleitung Punkt 1.4). Es wäre interessant zu wissen, ob CNGB1KO-Mäuse ebenfalls in der Lage sind, Düfte voneinander zu unterscheiden und welchen Einfluss dabei die Anwesenheit eines Hintergrundduftes hat. Zu erwarten wäre ein der CNGA4KO-Maus entsprechendes Verhalten.

Für die Bedeutung von CNGB1b im Riechprozess lässt sich also folgendes festhalten: CNGB1b erhöht die Sensitivität des CNG-Kanals in olfaktorischen Rezeptorneuronen gegenüber zyklischen Nukleotiden und erniedrigt somit die Konzentrationsschwelle zur Detektion eines Duftes. Zudem reguliert CNGB1b die Frequenz des Single Channel Flickerings und damit die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals. Des weiteren verleiht CNGB1b dem olfaktorischen CNG-Kanal zusammen mit CNGA4 die Fähigkeit zur Calcium-CaM-abhängigen Inaktivierung. Dies befähigt die Mäuse zur schnellen Geruchsadaptation. In Abwesenheit von CNGB1b assemblieren CNGA2 und CNGA4 zwar zu einem prinzipiell funktionsfähigen heteromeren Kanal, jedoch ist CNGB1b essentiell für das Targeting des Kanals in die Zilienmembran. Ohne CNGB1b erfolgt ein Abbau des CNGA2/CNGA4-Kanals durch das Proteasom.

#### 4.2 Der Verlust von CNGB1b resultiert in morphologischen Veränderungen des olfaktorischen Systems

Die Morphologie des olfaktorischen Systems der CNGB1KO-Mäuse unterscheidet sich in einigen Punkten deutlich vom Wildtyp.

Obwohl die Reifung der olfaktorischen Rezeptorneurone in den CNGB1-defizienten Tieren offenbar nicht gestört ist, kommt es zu einer deutlichen Verminderung der Schichtdicke des olfaktorischen Epithels. Derselbe Sachverhalt wurde auch für CNGA2- und ACIII-defiziente Mäuse beschrieben<sup>60,65</sup>. Auf die Funktionalität des olfaktorischen Epithels hat die verminderte Schichtdicke bei den CNGB1KO-Mäusen allerdings keinen negativen Einfluss, die olfaktorischen Rezeptorneuronen sind in der Lage, auf Düfte zu antworten und das Signal auf periglomeruläre Zellen des Bulbus olfactorius zu übertragen.

Als Ursache für die verkleinerte Schichtdicke kommen apoptotische Vorgänge in Frage, wie man sie auch in der Retina von CNGB1-defizienten Mäusen findet. Dort kommt es durch Apoptose zu einem massiven Zelluntergang, der sich in einer stetigen Abnahme der äußeren Körnerschicht bemerkbar macht. Im Alter von zehn Monaten ist bei diesen Mäusen nur noch eine Schicht zu finden<sup>94</sup>. Im Gegensatz zu Photorezeptoren sind Riechneurone jedoch in der Lage, sich ständig neu zu bilden<sup>32</sup>, weshalb der Zellverlust zumindest teilweise kompensiert werden kann.

Auch der Bulbus olfactorius der CNGB1KO-Tiere ist kleiner ausgeprägt als beim Wildtyp. Zudem ist die Anzahl der Glomeruli, dem Eintrittsort der Filia olfactorii, verringert. Trotz dieser Auffälligkeiten ist der Bulbus olfactorius funktionsfähig.

Aus der Literatur ist bekannt, dass der Bulbus olfactorius sich zum einen nicht entwickelt und zum anderen degeneriert, wenn afferente Stimuli entfernt werden (beispielsweise durch Zunähen eines Nasenlochs oder mechanische Durchtrennung von afferenten Nervenfasern)<sup>112-116</sup>. Eine permanente Stimulierung des Riechkolbens über olfaktorische Rezeptorneuronen scheint also essentiell für dessen Entwicklung und Erhalt zu sein. Bei den CNGB1-defizienten Tieren konnte der afferente Input über ORNs zwar prinzipiell nachgewiesen werden, jedoch wäre es denkbar, dass einzelne Glomeruli weniger oder keinen Input erhalten. Die Glomeruli würden in der Folge verkümmern und das betreffende Gewebe degenerieren. Für diese Theorie spricht der Befund, dass die Gesamtzahl der Glomeruli im Bulbus olfactorius von CNGB1KO-Tieren im Vergleich zum Wildtyp verringert ist.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass CNGB1b unerlässlich für eine normale Entwicklung des olfaktorischen Epithels und des Bulbus olfactorius ist

### 4.3 Gestörtes Targeting des CNGB1KO-Kanals

Eine der wichtigsten Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit ist, dass der olfaktorische CNG-Kanal beide modulatorische Untereinheiten, also sowohl CNGA4 als auch CNGB1b, benötigt, um in die Zilienmembran der ORNs zu gelangen. Assembliert CNGA2 mit nur einer der beiden modulatorischen Untereinheiten, wird der heteromere Kanal zwar in die Membran dendritischer Knobs eingebaut, jedoch kann er nicht in die Zilien transportiert werden und bleibt in subziliären Kompartimenten gefangen.

Kürzlich wurde das Targeting von CNG-Kanälen in Zilien anhand der MDCK-Zelllinie (Madin-Darby canine kidney epithelial cells) untersucht. Hierbei handelt es sich um eine Nierenzelllinie, die ein einziges nichtmotiles Zilium besitzt und keine endogene Expression von CNG-Kanälen zeigt. Durch Überexpression des WT-CNG-Kanals sowie verschiedener Mutanten des olfaktorischen CNG-Kanals in diesen Zellen wurde im C-Terminus von CNGB1b ein RVXP-Motiv identifiziert, das essentiell für den Einbau von CNGA2 in die Zilien ist<sup>117</sup>. In derselben Studie wurde auch gezeigt, dass CNGA4 nicht für das Targeting in die Zilien der MDCK-Zellen benötigt wird. Im Gegensatz dazu zeigen unsere Ergebnisse klar, dass sowohl CNGA4 als auch CNGB1b nötig sind, um den CNG-Kanal richtig in der Zilienmembran einzubauen und somit den Abbau der Kanäle zu verhindern. Anders als MDCK-Zellen sind ORNs also offenbar in der Lage, die Qualität des gebildeten Kanals zu überprüfen und den aberranten Kanal vom ziliären Transport auszuschließen.

Vor kurzem wurde ein Checkpoint-Protein identifiziert (UNC-101), welches das Targeting von Odorantezeptoren in olfaktorische Zilien von *C. elegans* kontrolliert<sup>118,119</sup>. Ähnliche Proteine könnten sich in ORNs entwickelt haben, um dort das Targeting der CNG-Kanäle in das Zilienkompartiment zu steuern. Ein potentieller Kandidat ist das Motorprotein KIF17, das mit CNGB1b interagiert und für das Targeting der CNG-Kanäle in MDCK-Zellen verantwortlich ist<sup>117</sup>.

#### 4.4 Aktivierung des CNGB1KO-Kanals

Eine wichtige Frage bleibt offen: wie erfolgt die Aktivierung des CNGB1b-defizienten CNG-Kanals? Da eine räumliche Trennung der einzelnen Komponenten der Signalkaskade zu bestehen scheint (CNGA2 und CNGA4 im Knob, ACIII in der Zilienmembran), muss entweder cAMP in die Knobs diffundieren, um dort den Kanal zu aktivieren oder es muss cAMP in den Knobs selbst synthetisiert werden. Dass cAMP in kleinen Mengen auch in dendritischen Knobs gebildet wird, konnte bereits gezeigt werden<sup>120,121</sup>.

Da der CNGB1KO-Kanal aufgrund der fehlenden Ca-CaM-abhängigen Inhibition nach seiner Aktivierung für längere Zeit (verglichen mit dem WT-Kanal) im offenen Zustand verweilt, könnte mehr  $\text{Ca}^{2+}$  als erwartet in die Zelle fließen, um den  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chlorid-Kanal zu öffnen. Durch diesen Verstärkungsmechanismus könnte die geringere Kanalproteinmenge und die erniedrigte cAMP-Sensitivität des Kanals zumindest teilweise ausgeglichen werden. So könnte auch erklärt werden, warum die Amplitude im EOG bei CNGB1KO-Tieren nur um Faktor zwei bis drei verringert ist, obwohl der CNG-Strom zehn mal kleiner ist als bei WT-Tieren. Es würde auch erklären, warum CNGB1KO-Mäuse überhaupt riechen können, wenn auch mit geringerer Empfindlichkeit und Genauigkeit.

Es kann natürlich nicht ausgeschlossen werden, dass das verbleibende Riechvermögen über CNG-Kanal-unabhängige Signalwege vermittelt wird. Allerdings sprechen Untersuchungen an Mäusen, denen die cAMP-vermittelte Signalkaskade komplett fehlt (ACIIIKO-Maus<sup>65,66</sup>, CNGA2KO-Maus<sup>55,59,60</sup>), eindeutig gegen diese Theorie.

#### 4.5 Retinaler Phänotyp der CNGB1KO-Maus<sup>94</sup>

Interessanterweise können CNGB1-defiziente Mäuse auch eine Untereinheit des Stäbchen-CNG-Kanals (CNGB1) nicht in die Außensegmente der Photorezeptoren transportieren. Als Folge ist in der Retina dieser Mäuse eine Degeneration der Stäbchen zu beobachten, welche schließlich durch Apoptose sterben. Die Zapfenfunktion von CNGB1KO-Mäusen gleicht bis zu einem Alter von sechs Monaten der von Wildtyp-Mäusen, die Tiere sind also bis zu diesem Zeitpunkt lediglich nachtblind. Danach verlieren auch die Zapfen nach und nach ihre Funktionsfähigkeit, woraus schließlich völlige Blindheit resultiert. In der inneren Retina von CNGB1-defizienten Mäusen konnten neben apoptotischen Vorgängen auch Prozesse wie Gliose und Degeneration von Bipolar- und Horizontalzellen festgestellt werden.

Das beschriebene Krankheitsbild ist unter dem Begriff Retinitis pigmentosa bekannt. Retinitis pigmentosa ist ein Sammelbegriff für eine Familie erblicher degenerativer Erkrankungen der Netzhaut. Sie geht einher mit Pigmentablagerungen, Gesichtsfeldeinengung (sogenannter Tunnelblick) und Netzhautdegeneration, wobei es wie bei der CNGB1KO-Maus beschrieben zunächst zu einer Degeneration der Stäbchen und in der Folge auch zu einem Untergang der Zapfen kommt (für eine Übersicht siehe van Soest et al. 1999<sup>122</sup>, Phelan et al. 2000<sup>123</sup> und Hartong et al. 2006<sup>124</sup>).

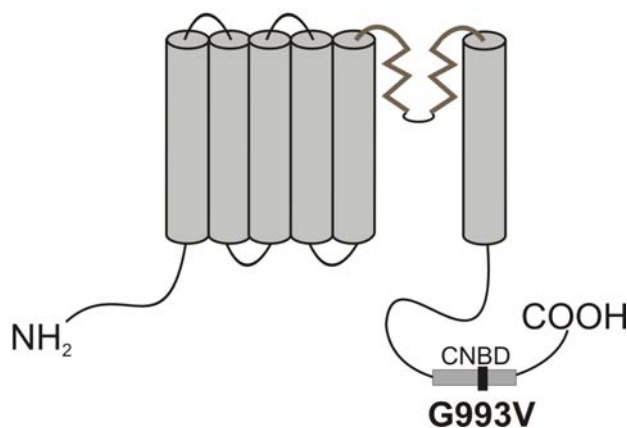
Während in olfaktorischen Rezeptorneuronen von CNGB1-defizienten Mäusen gar kein CNG-Kanalprotein in den Zilien (welche funktionell den Außensegmenten der Stäbchen entsprechen) nachweisbar ist, kann in der Retina von CNGB1KO-Mäusen bis zu einem Alter von drei Wochen noch ein sehr schwaches Restsignal eines homomeren CNGB1-Kanals in den Außensegmenten detektiert werden. Anders als in den ORNs der CNGB1-defizienten Mäuse kommt es in den Stäbchen nicht zu einer Akkumulation des CNGB1-Proteins in anderen Zellkompartimenten, was auf einen schnellen Abbau des aberranten Kanals hinweist. Trotz dieser Unterschiede resultiert letztlich die gleiche Situation in ORNs und Stäbchen der adulten CNGB1KO-Maus: es wird kein funktioneller CNG-Kanal am Ort der Signaltransduktion exprimiert.

Sowohl in der Retina als auch im olfaktorischen Epithel haben die betreffenden Neuronen also offenbar ein sehr effektives Kontrollsystem entwickelt, das sicherstellt, dass nur richtig assemblierte und voll funktionsfähige CNG-Kanäle in die Plasmamembran des entsprechenden Zellkompartiments (Außensegmente der Photorezeptoren oder Zilien der ORNs) eingebaut werden. Die Existenz eines solchen Systems unterstreicht die Wichtigkeit der Sinne Sehen und Riechen im Evolutionsprozess.

#### 4.6 CNGB1-Defekt im Menschen

Der Verlust der CNGB1-Funktion führt wie bei der CNGB1KO-Maus auch beim Menschen zum Krankheitsbild der Retinitis pigmentosa<sup>125</sup>.

Bisher ist eine Patientin bekannt, deren Netzhaut aufgrund einer homozygoten Punktmutation im CNGB1-Gen keine funktionellen Stäbchen besitzt<sup>125</sup>. Im Elektroretinogramm ist lediglich eine schwache Zapfenantwort induzierbar. Durch den Austausch von Guanin 2978 (Exon 30) gegen Thymin wird die über Untereinheiten und Spezies hochkonservierte Aminosäure Glycin 993 durch Valin ersetzt (G993V). Da das betroffene Exon für die CNBD codiert, ist anzunehmen, dass die Bindung von zyklischen Nukleotiden und somit die Aktivierbarkeit des Kanals beeinträchtigt oder gar nicht mehr vorhanden ist. Möglich wäre auch, dass der Kanal aufgrund der Mutation falsch gefaltet ist und nicht in die Stäbchenmembran transportiert wird.



**Abb. 4-1** Schematische Darstellung der G993V-Mutante. Die Punktmutation ist in der CNBD der CNG-Kanaluntereinheit lokalisiert.

Während das Krankheitsbild der Retinitis pigmentosa sowohl bei der erwähnten Patientin als auch der CNGB1-defizienten Maus zu beobachten war, konnte beim Menschen bisher keine Beeinträchtigung der Riechfunktion festgestellt werden.

Allerdings ist hier in Betracht zu ziehen, dass der Geruchssinn beim Menschen eine eher untergeordnete Rolle spielt, während er bei der Maus essentiell für das Überleben ist. Bei der Maus sind über 1000 funktionelle Gene für Duftrezeptoren bekannt<sup>35</sup>, beim Menschen dagegen findet man nur knapp 400<sup>36</sup>; der Rest wurde im Laufe der Evolution in Pseudogene umgewandelt. Im Gegensatz zur Maus ist der Mensch nur in begrenztem Maße fähig, sehr ähnliche Düfte voneinander zu unterscheiden und einzelne Düfte aus komplexen Duftgemischen zu identifizieren<sup>126</sup>. Zudem ist die Riechfähigkeit von Mensch zu Mensch unterschiedlich stark ausgeprägt, eventuell sind also intensivere Untersuchungen am Geruchssinn nötig, um eine Abweichung von der Norm feststellen zu können.



## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Zyklonukleotid-aktivierte Kationenkanäle (CNG-Kanäle) spielen eine Schlüsselrolle im Seh- und Riechprozess. Der olfaktorische CNG-Kanal besteht aus den Untereinheiten CNGA2, CNGA4 und CNGB1b. Sowohl CNGA4 als auch CNGB1b können in heterologen Expressionssystemen nur zusammen mit CNGA2 funktionelle Kanäle bilden. Sie werden auch als modulatorische Untereinheiten bezeichnet, da sie dem CNG-Kanal charakteristische Eigenschaften verleihen. In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle von CNGB1b im Riechprozess anhand einer CNGB1-defizienten Mauslinie (CNGB1KO-Maus) untersucht werden.

CNGB1KO-Mäuse zeigten im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtyp-Mäusen ein deutlich eingeschränktes Riechvermögen. Dieses äußerte sich in verringertem Körpergewicht, schlechterem Abschneiden in einem Riechtest und einem veränderten Elektroolfaktogramm (EOG). EOGs von CNGB1KO-Mäusen zeigten verglichen mit WT-Mäusen ein verzögertes Einsetzen, eine verkleinerte Amplitude und eine verlangsamte Rückbildung der Duftantwort. Als Ursache für die verzögert einsetzende Reizantwort konnte eine verringerte Sensitivität des CNG-Kanals gegenüber zyklischen Nukleotiden ausgemacht werden. Die verkleinerte Amplitude im EOG konnte durch eine verringerte Menge an Kanalprotein erklärt werden, was einen um Faktor zehn verminderten CNG-Strom zur Folge hatte. Das verlangsamte Abklingen der Duftantwort konnte auf ein Fehlen der Calcium-Calmodulin-abhängigen Inaktivierung des CNG-Stroms zurückgeführt werden. Eine Interaktion von CNGA2 und CNGA4 in CNGB1-defizienten Neuronen wurde durch Co-Immunpräzipitation nachgewiesen. Mittels immunhistochemischer Färbungen wurde gezeigt, dass CNGA2 und CNGA4 zwar assemblierten, nicht aber in die Zilienmembran der ORNs transportiert wurden. Vielmehr wurde der CNGA2/CNGA4-Kanal in subziliären Zellkompartimenten zurückgehalten. Der Versuch, die Translokation in das Zilium durch Hemmung des proteolytischen Abbaus der CNG-Untereinheiten zu ermöglichen, war nicht erfolgreich, was auf eine streng reglementierte Qualitätskontrolle in olfaktorischen Rezeptorneuronen schließen ließ. Morphologisch unterschied sich das olfaktorische System von CNGB1KO-Mäusen verglichen mit dem Wildtyp durch eine Reduktion der Schichtdicke des olfaktorischen Epithels sowie einen verkleinerten Bulbus olfactorius. Neurone des Bulbus olfactorius von CNGB1-defizienten Mäusen waren bezüglich ihrer Duftantwort nicht von Wildtyp-Neuronen zu unterscheiden.

Für die Bedeutung der CNGB1b-Untereinheit kann festgehalten werden, dass sie dem olfaktorischen CNG-Kanal charakteristische Eigenschaften wie erhöhte Empfindlichkeit gegenüber zyklischen Nukleotiden, die Fähigkeit zur Calcium-Calmodulin-abhängigen Inaktivierung und kontrolliertes Single Channel Flickering verleiht. Zudem spielt die CNGB1b-Untereinheit zusammen mit CNGA4 eine essentielle Rolle für den Transport des CNG-Kanals in die Zilienmembran der ORNs. Darüber hinaus ist CNGB1b unentbehrlich für eine normale Entwicklung des olfaktorischen Systems.

## 6 ANHANG

## 6.1 Verwendete Primer

Genotypisierung CNGB1				
Name	Gen	5'-Sequenz-3'	Produkt	Quelle
PSHV8F	mCNGB1	CCTCATGCATGCGACCTGAAAT	415bp (KO) 480bp (WT)	Hüttl et al. 2005 <sup>94</sup>
PSHV6bR	mCNGB1	GCCCAGACTAGAACACAAGTC		
PSHV9R	mCNGB1	CACAGCCATTACACATAGCAGTG		

Genotypisierung CNGA3				
Name	Gen	5'-Sequenz-3'	Produkt	Quelle
mCG7F	mCNGA3	TGCACGACTCTCCCGGAAGTACA	284bp	Biel et al. 1999 <sup>101</sup>
mCG8R	mCNGA3	ACCGGAATAACCCGAGTCTCCAAG		
mCG19F	mCNGA3	CTTAGGTTTCCTTGAGGCAAGG	320bp	Biel et al. 1999 <sup>101</sup>
NeoPA	Neomycin	GCCTGCTCTTTACTGAAGGCTCT		

RT-PCR				
Name	Gen	5'-Sequenz-3'	Produkt	Quelle
mCNGA2ex2/3for	mCNGA2	GTTGGCAGAGATGGATACTCC	271bp	Dissertation Michalakis 2003
mCNGA2ex4rev		ACGGTAATACCAGTCTCCAGC		
mCNG5-1for	mCNGA4	GTGGCTGCCAGTCCTAGACCCAT	297bp	Dissertation Michalakis 2003
mCNG5-1rev		GGACGCCAGGTCCAACAGGAAGC		
QG-197	mHPRT	GTAATGATCAGTCAACGGGGGAC	177bp	Dissertation Michalakis 2003
QG-198		CCAGCAAGCTTGCAACCTTAACCA		

## 6.2 Proteinmengen für Western Blots

Protein	aus Gewebe	Präparationsart	eingesetzte Menge $\mu\text{g}$	Proteingröße	% SDS-Gel
ACIII	OC+OE	Membranpräp mit Zilien angereichert, Fraktion S1 und S2a	10-15 $\mu\text{g}$	250kDa	7
ACIII	OE	Membranpräp	20-30 $\mu\text{g}$		
CNGB1b	OE	Membranpräp	40 $\mu\text{g}$	120kDa	10
CNGB1b	OC+OE	Membranpräp mit Zilien angereichert, Fraktion Fraktion S1 und S2a	20 $\mu\text{g}$		
CNGB1b	OB	Membranpräp	50 $\mu\text{g}$		
TH	OB	Membranpräp	50 $\mu\text{g}$	59kDa	10
Aktin	alle	alle	5-50 $\mu\text{g}$	45kDa	---
Tubulin	alle	alle	5-50 $\mu\text{g}$	55kDa	---
CNG-Kanäle überexprimiert	HEK293-Zellen	Membranpräp und Lysate	5-40 $\mu\text{g}$	---	7-10

### 6.3 Verwendete Antikörper

#### 6.3.1 Primärantikörper

Antigen	Antikörper	aus Spezies	Verdünnung	Quelle
ACIII	anti-ACIII	Kaninchen	IHC: 1:400 Western: 1:400	Santa Cruz, sc-588
CNGA2	C-AbmCNGA2	Kaninchen	IHC 1:300 Western: 1:1000	Michalakis et al 2006 <sup>127</sup>
CNGA3	C-AbmCNGA3	Kaninchen	IHC: 1:1000	Biel et al. 1999 <sup>101</sup>
CNGA4	C-AbmCNGA4	Meerschweinchen	IHC: 1:250 Western: 1:500	Michalakis et al. 2006 <sup>127</sup>
CNGB1, C-Terminus	C-AbmCNGB1	Kaninchen	IHC: 1:500 Western: 1:1000	Hüttl et al. 2004 <sup>94</sup>
CNGB1, N-Terminus	FPc21K	Kaninchen	IHC 1:400 Western 1:2500	Dr. U.B. Kaupp, FZJ Jülich
Fos	anti-cFos	Kaninchen	IHC: 1:400	Calbiochem, PC38T
GC-D	anti-GC-D	Kaninchen	IHC: 1:500	Dr. L. Garbers, Univ. of Texas
OMP	anti-OMP	Ziege	IHC 1:200	Dr. F. Margolis, Univ. of Maryland
PAK	anti-PAK	Kaninchen	Kontroll-AK für Co-IP	Santa Cruz, sc-882
PDE2	anti-PDE2	Huhn	IHC: 1:100	Dr. J. Beavo, Univ. of Washington
Tubulin $\alpha + \beta$	Klone DM1A+AM1B	Maus	Western: 1:400	Dianova, MS-719-P1
Tyrosinhydroxylase	anti-TH	Kaninchen	IHC: 1:400 Western: 1:1000	Chemicon, AB152
$\beta$ -Aktin	anti- $\beta$ -Aktin	Maus	Western: 1:5000	Sigma, A441

#### 6.3.2 Fluoreszenzmarkierte Primärantikörper

Antikörper	Spezies	NHS-Ester	Verdünnung
anti-ACIII	Kaninchen	DY-631	1:400
C-AbmCNGA3	Kaninchen	DY-547	1:1000
C-AbmCNGB1	Kaninchen	DY-547 und DY-631	1:400

**6.3.3 Sekundärantikörper**

<b>Antikörper</b>	<b>gegen Spezies</b>	<b>aus Spezies</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Quelle</b>
Biotin-anti-goat IgG	Ziege	Esel	IHC: 1:200	Jackson
Biotin-anti-rabbit IgG	Kaninchen	Esel	IHC: 1:200	Vector, aus Vectastain Kit PK4001
Cy2 anti-chicken	Huhn	Esel	IHC: 1:200	Jackson
Cy2 anti-rabbit	Kaninchen	Esel	IHC: 1:200	Jackson
DY-547 Streptavidin			IHC: 1:1000	Dyomics
FITC anti-rabbit	Kaninchen	Esel	IHC: 1:200	Jackson
HRP guinea pig	Meerschweinchen	Esel	Western: 1:2000	Jackson
HRP anti-mouse	Maus	Esel	Western: 1:2000	Amersham Pharmacia NA931
HRP anti-rabbit	Kaninchen	Esel	Western: 1:2000	Amersham Pharmacia NA 934
TexasRed anti-guinea pig IgG	Meerschweinchen	Esel	IHC: 1:600	Jackson

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Fesenko, E. E., Kolesnikov, S. S. & Lyubarsky, A. L. Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment. *Nature* 313, 310-3 (1985).
2. Nakamura, T. & Gold, G. H. A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. *Nature* 325, 442-4 (1987).
3. Biel, M. et al. Another member of the cyclic nucleotide-gated channel family, expressed in testis, kidney, and heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 3505-9 (1994).
4. Ruiz, M. L., London, B. & Nadal-Ginard, B. Cloning and characterization of an olfactory cyclic nucleotide-gated channel expressed in mouse heart. *J Mol Cell Cardiol* 28, 1453-61 (1996).
5. Kaupp, U. B. & Seifert, R. Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol Rev* 82, 769-824 (2002).
6. Kaupp, U. B. et al. Primary structure and functional expression from complementary DNA of the rod photoreceptor cyclic GMP-gated channel. *Nature* 342, 762-6 (1989).
7. Dhallan, R. S., Yau, K. W., Schrader, K. A. & Reed, R. R. Primary structure and functional expression of a cyclic nucleotide-activated channel from olfactory neurons. *Nature* 347, 184-7 (1990).
8. Ludwig, J., Margalit, T., Eismann, E., Lancet, D. & Kaupp, U. B. Primary structure of cAMP-gated channel from bovine olfactory epithelium. *FEBS Lett* 270, 24-9 (1990).
9. Chen, T. Y. et al. A new subunit of the cyclic nucleotide-gated cation channel in retinal rods. *Nature* 362, 764-7 (1993).
10. Bradley, J., Li, J., Davidson, N., Lester, H. A. & Zinn, K. Heteromeric olfactory cyclic nucleotide-gated channels: a subunit that confers increased sensitivity to cAMP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8890-4 (1994).
11. Korschen, H. G. et al. A 240 kDa protein represents the complete beta subunit of the cyclic nucleotide-gated channel from rod photoreceptor. *Neuron* 15, 627-36 (1995).
12. Sautter, A., Zong, X., Hofmann, F. & Biel, M. An isoform of the rod photoreceptor cyclic nucleotide-gated channel beta subunit expressed in olfactory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4696-701 (1998).
13. Gerstner, A., Zong, X., Hofmann, F. & Biel, M. Molecular cloning and functional characterization of a new modulatory cyclic nucleotide-gated channel subunit from mouse retina. *J Neurosci* 20, 1324-32 (2000).

14. Liman, E. R. & Buck, L. B. A second subunit of the olfactory cyclic nucleotide-gated channel confers high sensitivity to cAMP. *Neuron* 13, 611-21 (1994).
15. Broillet, M. C. & Firestein, S. Beta subunits of the olfactory cyclic nucleotide-gated channel form a nitric oxide activated Ca<sup>2+</sup> channel. *Neuron* 18, 951-8 (1997).
16. Liu, D. T., Tibbs, G. R. & Siegelbaum, S. A. Subunit stoichiometry of cyclic nucleotide-gated channels and effects of subunit order on channel function. *Neuron* 16, 983-90 (1996).
17. Peng, C., Rich, E. D. & Varnum, M. D. Subunit configuration of heteromeric cone cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron* 42, 401-10 (2004).
18. Zhong, H., Molday, L. L., Molday, R. S. & Yau, K. W. The heteromeric cyclic nucleotide-gated channel adopts a 3A:1B stoichiometry. *Nature* 420, 193-8 (2002).
19. Weitz, D., Ficek, N., Kremmer, E., Bauer, P. J. & Kaupp, U. B. Subunit stoichiometry of the CNG channel of rod photoreceptors. *Neuron* 36, 881-9 (2002).
20. Zheng, J., Trudeau, M. C. & Zagotta, W. N. Rod cyclic nucleotide-gated channels have a stoichiometry of three CNGA1 subunits and one CNGB1 subunit. *Neuron* 36, 891-6 (2002).
21. Zheng, J. & Zagotta, W. N. Stoichiometry and assembly of olfactory cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron* 42, 411-21 (2004).
22. Finn, J. T., Grunwald, M. E. & Yau, K. W. Cyclic nucleotide-gated ion channels: an extended family with diverse functions. *Annu Rev Physiol* 58, 395-426 (1996).
23. Biel, M., Zong, X., Ludwig, A., Sautter, A. & Hofmann, F. Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 135, 151-71 (1999).
24. Matulef, K. & Zagotta, W. N. Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19, 23-44 (2003).
25. Bradley, J., Reisert, J. & Frings, S. Regulation of cyclic nucleotide-gated channels. *Curr Opin Neurobiol* 15, 343-9 (2005).
26. Ardell, M. D., Bedsole, D. L., Schoborg, R. V. & Pittler, S. J. Genomic organization of the human rod photoreceptor cGMP-gated cation channel beta-subunit gene. *Gene* 245, 311-8 (2000).
27. Biel, M., Zong, X., Ludwig, A., Sautter, A. & Hofmann, F. Molecular cloning and expression of the Modulatory subunit of the cyclic nucleotide-gated cation channel. *J Biol Chem* 271, 6349-55 (1996).

28. Wiesner, B. et al. Cyclic nucleotide-gated channels on the flagellum control  $\text{Ca}^{2+}$  entry into sperm. *J Cell Biol* 142, 473-84 (1998).
29. Bonigk, W. et al. The native rat olfactory cyclic nucleotide-gated channel is composed of three distinct subunits. *J Neurosci* 19, 5332-47 (1999).
30. Bradley, J., Bonigk, W., Yau, K. W. & Frings, S. Calmodulin permanently associates with rat olfactory CNG channels under native conditions. *Nat Neurosci* 7, 705-10 (2004).
31. Shepherd, G. M., Getchell, T. V. & Mistretta, C. M. Neurobiology. Questions of taste and smell. *Nature* 324, 17-8 (1986).
32. Graziadei, G. A. & Graziadei, P. P. Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. II. Degeneration and reconstitution of the olfactory sensory neurons after axotomy. *J Neurocytol* 8, 197-213 (1979).
33. Royet, J. P., Souchier, C., Jourdan, F. & Ploye, H. Morphometric study of the glomerular population in the mouse olfactory bulb: numerical density and size distribution along the rostrocaudal axis. *J Comp Neurol* 270, 559-68 (1988).
34. Mombaerts, P. Genes and ligands for odorant, vomeronasal and taste receptors. *Nat Rev Neurosci* 5, 263-78 (2004).
35. Buck, L. & Axel, R. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* 65, 175-87 (1991).
36. Gilad, Y., Man, O., Paabo, S. & Lancet, D. Human specific loss of olfactory receptor genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 3324-7 (2003).
37. Malnic, B., Hirono, J., Sato, T. & Buck, L. B. Combinatorial receptor codes for odors. *Cell* 96, 713-23 (1999).
38. Nakamura, T., Tsuru, K. & Miyamoto, S. Regulation of  $\text{Ca}^{2+}$  concentration by second messengers in newt olfactory receptor cell. *Neurosci Lett* 171, 197-200 (1994).
39. Kurahashi, T. & Yau, K. W. Co-existence of cationic and chloride components in odorant-induced current of vertebrate olfactory receptor cells. *Nature* 363, 71-4 (1993).
40. Kleene, S. J. & Gesteland, R. C. Calcium-activated chloride conductance in frog olfactory cilia. *J Neurosci* 11, 3624-9 (1991).
41. Lowe, G. & Gold, G. H. Nonlinear amplification by calcium-dependent chloride channels in olfactory receptor cells. *Nature* 366, 283-6 (1993).



42. Kurahashi, T. & Menini, A. Mechanism of odorant adaptation in the olfactory receptor cell. *Nature* 385, 725-9 (1997).
43. Borisy, F. F. et al. Calcium/calmodulin-activated phosphodiesterase expressed in olfactory receptor neurons. *J Neurosci* 12, 915-23 (1992).
44. Yan, C. et al. Molecular cloning and characterization of a calmodulin-dependent phosphodiesterase enriched in olfactory sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9677-81 (1995).
45. Boekhoff, I., Schleicher, S., Strotmann, J. & Breer, H. Odor-induced phosphorylation of olfactory cilia proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 11983-7 (1992).
46. Wei, J. et al. Phosphorylation and inhibition of olfactory adenylyl cyclase by CaM kinase II in Neurons: a mechanism for attenuation of olfactory signals. *Neuron* 21, 495-504 (1998).
47. Zufall, F. & Leinders-Zufall, T. The cellular and molecular basis of odor adaptation. *Chem Senses* 25, 473-81 (2000).
48. Chen, T. Y., Takeuchi, H. & Kurahashi, T. Odorant inhibition of the olfactory cyclic nucleotide-gated channel with a native molecular assembly. *J Gen Physiol* 128, 365-71 (2006).
49. Fulle, H. J. et al. A receptor guanylyl cyclase expressed specifically in olfactory sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 3571-5 (1995).
50. Juilfs, D. M. et al. A subset of olfactory neurons that selectively express cGMP-stimulated phosphodiesterase (PDE2) and guanylyl cyclase-D define a unique olfactory signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3388-95 (1997).
51. Meyer, M. R., Angele, A., Kremmer, E., Kaupp, U. B. & Muller, F. A cGMP-signaling pathway in a subset of olfactory sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10595-600 (2000).
52. Meredith, M. Vomeronasal, olfactory, hormonal convergence in the brain. Cooperation or coincidence? *Ann N Y Acad Sci* 855, 349-61 (1998).
53. Keverne, E. B. The vomeronasal organ. *Science* 286, 716-20 (1999).
54. Wysocki, C. J. & Lepri, J. J. Consequences of removing the vomeronasal organ. *J Steroid Biochem Mol Biol* 39, 661-9 (1991).
55. Lin, W., Arellano, J., Slotnick, B. & Restrepo, D. Odors detected by mice deficient in cyclic nucleotide-gated channel subunit A2 stimulate the main olfactory system. *J Neurosci* 24, 3703-10 (2004).

56. Yoon, H., Enquist, L. W. & Dulac, C. Olfactory inputs to hypothalamic neurons controlling reproduction and fertility. *Cell* 123, 669-82 (2005).
57. Mandiyan, V. S., Coats, J. K. & Shah, N. M. Deficits in sexual and aggressive behaviors in *Cnga2* mutant mice. *Nat Neurosci* 8, 1660-2 (2005).
58. Boehm, U., Zou, Z. & Buck, L. B. Feedback loops link odor and pheromone signaling with reproduction. *Cell* 123, 683-95 (2005).
59. Brunet, L. J., Gold, G. H. & Ngai, J. General anosmia caused by a targeted disruption of the mouse olfactory cyclic nucleotide-gated cation channel. *Neuron* 17, 681-93 (1996).
60. Baker, H. et al. Targeted deletion of a cyclic nucleotide-gated channel subunit (OCNC1): biochemical and morphological consequences in adult mice. *J Neurosci* 19, 9313-21 (1999).
61. Keller, A. & Margolis, F. L. Immunological studies of the rat olfactory marker protein. *J Neurochem* 24, 1101-6 (1975).
62. Verhaagen, J., Oestreicher, A. B., Gispen, W. H. & Margolis, F. L. The expression of the growth associated protein B50/GAP43 in the olfactory system of neonatal and adult rats. *J Neurosci* 9, 683-91 (1989).
63. Munger, S. D. et al. Central role of the CNGA4 channel subunit in Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-dependent odor adaptation. *Science* 294, 2172-5 (2001).
64. Kelliher, K. R., Ziesmann, J., Munger, S. D., Reed, R. R. & Zufall, F. Importance of the CNGA4 channel gene for odor discrimination and adaptation in behaving mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4299-304 (2003).
65. Wong, S. T. et al. Disruption of the type III adenylyl cyclase gene leads to peripheral and behavioral anosmia in transgenic mice. *Neuron* 27, 487-97 (2000).
66. Trinh, K. & Storm, D. R. Vomeronasal organ detects odorants in absence of signaling through main olfactory epithelium. *Nat Neurosci* 6, 519-25 (2003).
67. Belluscio, L., Gold, G. H., Nemes, A. & Axel, R. Mice deficient in G(olf) are anosmic. *Neuron* 20, 69-81 (1998).
68. Ibanez-Tallon, I., Heintz, N. & Omran, H. To beat or not to beat: roles of cilia in development and disease. *Hum Mol Genet* 12 Spec No 1, R27-35 (2003).
69. Barnes, B. G. Ciliated secretory cells in the pars distalis of the mouse hypophysis. *J Ultrastruct Res* 5, 453-67 (1961).

70. Handel, M. et al. Selective targeting of somatostatin receptor 3 to neuronal cilia. *Neuroscience* 89, 909-26 (1999).
71. Yoder, B. K., Hou, X. & Guay-Woodford, L. M. The polycystic kidney disease proteins, polycystin-1, polycystin-2, polaris, and cystin, are co-localized in renal cilia. *J Am Soc Nephrol* 13, 2508-16 (2002).
72. Brailov, I. et al. Localization of 5-HT(6) receptors at the plasma membrane of neuronal cilia in the rat brain. *Brain Res* 872, 271-5 (2000).
73. Johnson, K. A. & Rosenbaum, J. L. Polarity of flagellar assembly in *Chlamydomonas*. *J Cell Biol* 119, 1605-11 (1992).
74. Rieder, C. L., Faruki, S. & Khodjakov, A. The centrosome in vertebrates: more than a microtubule-organizing center. *Trends Cell Biol* 11, 413-9 (2001).
75. Rosenbaum, J. L., Cole, D. G. & Diener, D. R. Intraflagellar transport: the eyes have it. *J Cell Biol* 144, 385-8 (1999).
76. Kozminski, K. G., Beech, P. L. & Rosenbaum, J. L. The *Chlamydomonas* kinesin-like protein FLA10 is involved in motility associated with the flagellar membrane. *J Cell Biol* 131, 1517-27 (1995).
77. Kozminski, K. G., Johnson, K. A., Forscher, P. & Rosenbaum, J. L. A motility in the eukaryotic flagellum unrelated to flagellar beating. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5519-23 (1993).
78. Scholey, J. M. Kinesin-II, a membrane traffic motor in axons, axonemes, and spindles. *J Cell Biol* 133, 1-4 (1996).
79. Praetorius, H. A. & Spring, K. R. A physiological view of the primary cilium. *Annu Rev Physiol* 67, 515-29 (2005).
80. Singla, V. & Reiter, J. F. The primary cilium as the cell's antenna: signaling at a sensory organelle. *Science* 313, 629-33 (2006).
81. Badano, J. L., Mitsuma, N., Beales, P. L. & Katsanis, N. The Ciliopathies: An Emerging Class of Human Genetic Disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 7, 125-148 (2006).
82. Zariwala, M. A., Knowles, M. R. & Omran, H. Genetic Defects in Ciliary Structure and Function. *Annu Rev Physiol* (2006).
83. Marszalek, J. R. et al. Genetic evidence for selective transport of opsin and arrestin by kinesin-II in mammalian photoreceptors. *Cell* 102, 175-87 (2000).

84. Kulaga, H. M. et al. Loss of BBS proteins causes anosmia in humans and defects in olfactory cilia structure and function in the mouse. *Nat Genet* 36, 994-8 (2004).
85. Bisceglia, M., Galliani, C. A., Senger, C., Stallone, C. & Sessa, A. Renal cystic diseases: a review. *Adv Anat Pathol* 13, 26-56 (2006).
86. Hanaoka, K. et al. Co-assembly of polycystin-1 and -2 produces unique cation-permeable currents. *Nature* 408, 990-4 (2000).
87. Katsanis, N., Lupski, J. R. & Beales, P. L. Exploring the molecular basis of Bardet-Biedl syndrome. *Hum Mol Genet* 10, 2293-9 (2001).
88. Beales, P. L., Elcioglu, N., Woolf, A. S., Parker, D. & Flinter, F. A. New criteria for improved diagnosis of Bardet-Biedl syndrome: results of a population survey. *J Med Genet* 36, 437-46 (1999).
89. Green, J. S. et al. The cardinal manifestations of Bardet-Biedl syndrome, a form of Laurence-Moon-Biedl syndrome. *N Engl J Med* 321, 1002-9 (1989).
90. Blacque, O. E. & Leroux, M. R. Bardet-Biedl syndrome: an emerging pathomechanism of intracellular transport. *Cell Mol Life Sci* 63, 2145-61 (2006).
91. Li, J. B. et al. Comparative genomics identifies a flagellar and basal body proteome that includes the BBS5 human disease gene. *Cell* 117, 541-52 (2004).
92. Kim, J. C. et al. MKKS/BBS6, a divergent chaperonin-like protein linked to the obesity disorder Bardet-Biedl syndrome, is a novel centrosomal component required for cytokinesis. *J Cell Sci* 118, 1007-20 (2005).
93. Kim, J. C. et al. The Bardet-Biedl protein BBS4 targets cargo to the pericentriolar region and is required for microtubule anchoring and cell cycle progression. *Nat Genet* 36, 462-70 (2004).
94. Huttl, S. et al. Impaired channel targeting and retinal degeneration in mice lacking the cyclic nucleotide-gated channel subunit CNGB1. *J Neurosci* 25, 130-8 (2005).
95. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-7 (1977).
96. Birnboim, H. C. & Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-23 (1979).
97. Washburn, K. B., Turner, T. J. & Talamo, B. R. Comparison of mechanical agitation and calcium shock methods for preparation of a membrane fraction enriched in olfactory cilia. *Chem Senses* 27, 635-42 (2002).

98. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-54 (1976).
99. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5 (1970).
100. Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. & Nairn, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36, 59-74 (1977).
101. Biel, M. et al. Selective loss of cone function in mice lacking the cyclic nucleotide-gated channel CNG3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 7553-7 (1999).
102. Lee, D. H. & Goldberg, A. L. Selective inhibitors of the proteasome-dependent and vacuolar pathways of protein degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 271, 27280-4 (1996).
103. Spehr, M., Wetzel, C. H., Hatt, H. & Ache, B. W. 3-phosphoinositides modulate cyclic nucleotide signaling in olfactory receptor neurons. *Neuron* 33, 731-9 (2002).
104. Wetzel, C. H. et al. Specificity and sensitivity of a human olfactory receptor functionally expressed in human embryonic kidney 293 cells and *Xenopus Laevis* oocytes. *J Neurosci* 19, 7426-33 (1999).
105. Reisert, J., Bauer, P. J., Yau, K. W. & Frings, S. The Ca-activated Cl channel and its control in rat olfactory receptor neurons. *J Gen Physiol* 122, 349-63 (2003).
106. Reisert, J., Lai, J., Yau, K. W. & Bradley, J. Mechanism of the excitatory Cl<sup>-</sup> response in mouse olfactory receptor neurons. *Neuron* 45, 553-61 (2005).
107. Teicher, M. H. & Blass, E. M. First suckling response of the newborn albino rat: the roles of olfaction and amniotic fluid. *Science* 198, 635-6 (1977).
108. Hudson, R. & Distel, H. Pheromonal release of suckling in rabbits does not depend on the vomeronasal organ. *Physiol Behav* 37, 123-8 (1986).
109. Risser, J. M. & Slotnick, B. M. Nipple attachment and survival in neonatal olfactory bulbectomized rats. *Physiol Behav* 40, 545-9 (1987).
110. Nadi, N. S. et al. Chemical deafferentation of the olfactory bulb: plasticity of the levels of tyrosine hydroxylase, dopamine and norepinephrine. *Brain Res* 213, 365-77 (1981).
111. Guthrie, K. M., Anderson, A. J., Leon, M. & Gall, C. Odor-induced increases in c-fos mRNA expression reveal an anatomical "unit" for odor processing in olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 3329-33 (1993).

112. Frazier, L. L. & Brunjes, P. C. Unilateral odor deprivation: early postnatal changes in olfactory bulb cell density and number. *J Comp Neurol* 269, 355-70 (1988).
113. Baker, H. Unilateral, neonatal olfactory deprivation alters tyrosine hydroxylase expression but not aromatic amino acid decarboxylase or GABA immunoreactivity. *Neuroscience* 36, 761-71 (1990).
114. Baker, H., Morel, K., Stone, D. M. & Maruniak, J. A. Adult naris closure profoundly reduces tyrosine hydroxylase expression in mouse olfactory bulb. *Brain Res* 614, 109-16 (1993).
115. Tsukatani, T. et al. Bulbar morphology and expression of bulbar dopamine and parvalbumin in experimentally-induced anosmic rats. *Acta Otolaryngol* 115, 539-42 (1995).
116. Poling, K. R. & Brunjes, P. C. Sensory deafferentation and olfactory bulb morphology in the zebrafish and related species. *Brain Res* 856, 135-41 (2000).
117. Jenkins, P. M. et al. Ciliary targeting of olfactory CNG channels requires the CNGB1b subunit and the kinesin-2 motor protein, KIF17. *Curr Biol* 16, 1211-6 (2006).
118. Dwyer, N. D., Adler, C. E., Crump, J. G., L'Etoile, N. D. & Bargmann, C. I. Polarized dendritic transport and the AP-1 mu1 clathrin adaptor UNC-101 localize odorant receptors to olfactory cilia. *Neuron* 31, 277-87 (2001).
119. McClintock, T. S. & Sammeta, N. Trafficking prerogatives of olfactory receptors. *Neuroreport* 14, 1547-52 (2003).
120. Menco, B. P., Bruch, R. C., Dau, B. & Danho, W. Ultrastructural localization of olfactory transduction components: the G protein subunit Golf alpha and type III adenylyl cyclase. *Neuron* 8, 441-53 (1992).
121. Menco, B. P. Ultrastructural aspects of olfactory signaling. *Chem Senses* 22, 295-311 (1997).
122. van Soest, S., Westerveld, A., de Jong, P. T., Bleeker-Wagemakers, E. M. & Bergen, A. A. Retinitis pigmentosa: defined from a molecular point of view. *Surv Ophthalmol* 43, 321-34 (1999).
123. Phelan, J. K. & Bok, D. A brief review of retinitis pigmentosa and the identified retinitis pigmentosa genes. *Mol Vis* 6, 116-24 (2000).
124. Hartong, D. T., Berson, E. L. & Dryja, T. P. Retinitis pigmentosa. *Lancet* 368, 1795-809 (2006).
125. Bareil, C. et al. Segregation of a mutation in CNGB1 encoding the beta-subunit of the rod cGMP-gated channel in a family with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Hum Genet* 108, 328-34 (2001).

126. Marshall, K., Laing, D. G., Jinks, A. & Hutchinson, I. The capacity of humans to identify components in complex odor-taste mixtures. *Chem Senses* 31, 539-45 (2006).
127. Michalakis, S. et al. Loss of CNGB1 protein leads to olfactory dysfunction and subciliary cyclic nucleotide-gated channel trapping. *J Biol Chem* 281, 35156-66 (2006).

## 8 PUBLIKATIONEN

Hüttl S, Michalakis S, Seeliger S, Luo D, Acar N, **Geiger H**, Hudl K, Mader R, Haverkamp S, Moser M, Pfeifer A, Gerstner A, Yau KW, Biel M. Impaired channel targeting and retinal degeneration in mice lacking the cyclic nucleotide-gated channel subunit CNGB1. **J. Neurosci.** 25:130-138 (2005).

Michalakis S, **Geiger H**, Haverkamp S, Hofmann F, Gerstner A, Biel M. Impaired opsin targeting and cone photoreceptor migration in the retina of mice lacking the cyclic nucleotide-gated channel CNGA3. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci** 46:1516-1524 (2005).

Michalakis S\*, Reisert J\*, **Geiger H**, Wetzel CH, Zong X, Bradley J, Spehr M, Hüttl S, Gerstner A, Pfeifer A, Hatt H, Yau KW, Biel M. Loss of CNGB1 protein leads to olfactory dysfunction and subciliary CNG channel trapping. **J Biol Chem.** 2006 Nov 17;281(46):35156-66.



## 9 DANKSAGUNG

Bei Herrn Prof. Dr. Martin Biel bedanke ich mich für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die Betreuung der Arbeit und die stets offene Tür für Probleme und Fragen.

Ein herzliches Dankeschön an Herrn PD Dr. Carsten Culmsee für die Übernahme des Koreferats.

Herrn Dr. Stylianos Michalakis danke ich für die Betreuung und die zahlreichen anregenden Diskussionen während meiner Arbeit. Besonders bedanken möchte ich mich bei ihm für die fundierte Einarbeitung in alle Gebiete der Histologie samt Mikroskopie und die Präparation von Mäuseteilen aller Art. In diesem Zusammenhang danke ich auch Frau Dr. Andrea Gerstner, die mir die Grundlagen des molekularbiologischen Arbeitens beigebracht hat. Ferner bedanke ich mich bei den Herren Dr. Xiangang Zong, Dr. Christian Wetzels, Dr. Johannes Reiser, Dr. Jonathan Bradley und Dr. Marc Spehr für die Durchführung diverser Experimente.

Mein besonderer Dank geht an Frau Berit Noack, die mir im Labor stets hilfsbereit zur Hand ging, unseren beiden HiWis, Herrn Prakti Gruner und Herrn Schieder Michael, sowie unseren Praktikanten Max dem Peters und Frau Thomas Fröhlich. An dieser Stelle auch ein herzliches Dankeschön für zahlreiche Feierabend-Bierchen und Studentenfeten. Ein Extra-Danke geht an Max für geleistete Pizza-Anlieferungs-Dienste, vorzugsweise Freitag abends und an den Michi für diverse Gletscherausflüge.

Das gute Arbeitsklima und die freundschaftliche Stimmung im Laboralltag haben alle Mitarbeiter des Lehrstuhls zu „verantworten“. Vielen Dank an Euch alle! Krissy, Steffi und Nina: schön, dass wir uns noch kennen gelernt haben. Krissy, vielen Dank fürs Korrekturlesen und das allzeit bereite Gästebett.

Für die kritische Durchsicht der Arbeit und Verbesserungsvorschläge danke ich Stylianos Michalakis, Christian Wahl und Christian Eckert.

Herr Dr. Christian Schott-Wa(h)l brachte mir die Kunst des Pernod-Trinkens bei. Prost, auf dass der Pernod-Vorrat in Deinem Büro nie zur Neige gehen möge. Frau Dr. Pine Werner danke ich für die schöne Zusammenarbeit in meinem ersten Jahr, lustige Momente inner- und außerhalb des Labors und die Erzeugung meiner Lieblingsmäuse.

Den Doktoren Roti, Lugg und Ecki sowie den Nochnichtganz-Doktoren Kathi und Bodo danke ich für kreative Freizeitgestaltung, Schandtaten aller Art, trainierte Lachmuskeln, sehr viel Geduld und schier unendliche Leidensfähigkeit. Ecki, danke für Deine kompetente Betreuung außerhalb des Labors und viele lustige Erlebnisse, sei es auf einem Berg, in der Tram, in Deiner Küche oder sonstwo.

Lugg, Dir danke ich für Deine mit Be(- und manchmal wohl auch Ent-)geisterung ausgeübte Nebentätigkeit als 365Tage-24Stunden-Bereitschaftsdienst für alle Angelegenheiten.

**10 LEBENS LAUF****Persönliche Daten**

---

Name: Adelheid Andrea Geiger  
Anschrift: Am Harras 14  
81373 München  
Geburtsdatum, -ort: 18. Juli 1978, München  
Staatsangehörigkeit : deutsch

**Schule, Studium**

---

09/89 – 06/98	<b>Schulausbildung</b> Gymnasium Miesbach, naturwissenschaftlicher Zweig
11/98 – 10/02	<b>Studium der Pharmazie</b> LMU München
08/00	<b>1. Staatsexamen</b>
10/02	<b>2. Staatsexamen</b>

**Praktische Ausbildung**

---

11/02 – 04/03	<b>Markt-Apotheke</b> , Miesbach
05/03 – 10/03	<b>Hexal Pharmaforschung GmbH</b> , Holzkirchen
11/03	<b>3. Staatsexamen</b>
12/03	Erteilung der <b>Approbation als Apothekerin</b>

**Beruflicher Werdegang**

---

12/03 – 01/07	<b>Wissenschaftliche Mitarbeiterin/Doktorandin</b> Ludwig-Maximilians-Universität München Department Pharmazie Lehrstuhl Pharmakologie für Naturwissenschaften Prof. Dr. Martin Biel
---------------	--